

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-511635

(P2011-511635A)

(43) 公表日 平成23年4月14日(2011.4.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B024
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02 ZNA	4B029
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B063
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4B065
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-545612 (P2010-545612)
 (86) (22) 出願日 平成21年2月11日 (2009.2.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年10月7日 (2010.10.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2009/000163
 (87) 国際公開番号 W02009/101620
 (87) 国際公開日 平成21年8月20日 (2009.8.20)
 (31) 優先権主張番号 61/064,005
 (32) 優先日 平成20年2月11日 (2008.2.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500545311
 ハダシット メディカル リサーチ サー
 ビシーズ アンド ディベロップメント
 リミテッド
 イスラエル国 エルサレム 91120
 キリヤット ハダサー ビーオービー 1
 2000
 (71) 出願人 505291125
 ラドウィグ インスティテュート フォー
 キャンサー リサーチ
 アメリカ合衆国 10158 ニューヨー
 ク ニューヨーク 3番 アベニュー 6
 05
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌標識としての結腸癌関連転写因子1 (CCAT-1)

(57) 【要約】

本発明は癌細胞、特に結腸、直腸および肺の癌、並びに前癌病変に、特異的に発現する結腸癌関連転写産物1 (CCAT-1) と呼ばれる固有の核酸転写産物の、識別、分離、および配列決定に関する。従って、本発明はCCAT-1並びに分離したポリヌクレオチドの発現を検出することによる癌を診断する方法、本発明の検出方法で使用する組成物およびキットを提供する。

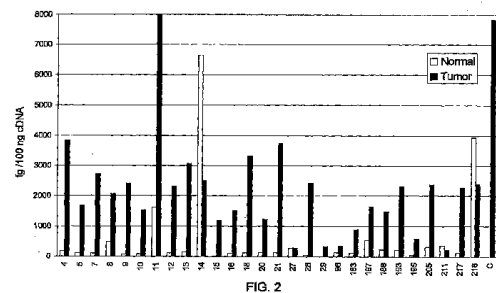


FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体サンプルにおいてSEQ ID NO. : 1 (CCAT-1) またはその断片の発現レベルを測定する工程を含む癌または前癌病変の診断方法であって、生体サンプルにおけるSEQ ID NO. : 1 (CCAT-1) またはその断片の発現は癌または前癌病変を示す癌または前癌病変の診断方法。

【請求項 2】

前記方法はさらに生体サンプルで測定した前記発現レベルと基準を比較する工程を含み、
生体サンプルにおけるSEQ ID NO. : 1 (CCAT-1) またはその断片の比較的高い発現レベルは癌または前癌病変を示す、請求項 1 に記載の癌または前癌病変を診断方法。

10

【請求項 3】

(a) 対象から得た生体サンプルからの核酸を分離する工程と、
(b) ハイブリッド複合体の形成を可能にする状況下で、CCAT-1 と前記核酸を認識できるプローブをハイブリッドさせる工程と、
(c) ハイブリッド複合体形成体を基準と比較する工程とを含み、
生体サンプルにおけるハイブリッド複合体の比較的高いレベルは癌または前癌病変を示す、請求項 2 に係る癌または前癌病変の診断方法。

20

【請求項 4】

(a) 対象から得た生体サンプルから核酸を分離する工程と、
(b) 前記分離した核酸で、CCAT-1 またはそのいずれかの断片を増幅する工程と、
(c) CCAT-1 増幅産物を視覚化する工程と、
(d) CCAT-1 増幅産物の量と基準を比較する工程とを含み、
CCAT-1 増幅産物の比較的高いレベルの存在は癌または前癌病変を示す、請求項 2 に記載の癌または前癌病変の診断方法。

【請求項 5】

前記増幅を、CCAT-1 の特異的なプローブを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって行う、請求項 4 に係る癌または前癌病変の診断方法。

30

【請求項 6】

前記 PCR はリアルタイム定量 PCR である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記基準を、癌を患っていない対象で、CCAT-1 の発現レベルを測定して決定する、請求項 2 ~ 4 いずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記基準を、前記と同じ対象の非癌組織で、CCAT-1 発現のレベルを測定することで決める、請求項 2 ~ 4 に記載の方法。

【請求項 9】

癌は、大腸癌、直腸癌、肺癌および前記癌の転移から成る群から選択される、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 10】

前癌病変は、腺腫性ポリープである、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記生体サンプルは、組織、血液、尿、糞便、および骨髓サンプルから成る群から選択される前記請求項のいずれか一項に方法。

【請求項 12】

前記生体サンプルは、組織生検である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

発現レベルは *in situ* ハイブリダイゼーションで測定される、請求項 1 の方法。

50

【請求項 14】

SEQ ID NO. : 1 (CCAT-1) またはその相補体の、少なくとも 8 つ隣接したヌクレオチドを含む、分離オリゴヌクレオチド。

【請求項 15】

プローブまたはプライマーとして使用する、請求項 14 に記載の分離オリゴヌクレオチド。

【請求項 16】

プローブは SEQ ID NO. : 5 を含む、請求項 15 に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 17】

生体サンプルで、CCAT-1 発現の検出に使用する、請求項 14 ~ 16 のいずれか一項に記載の分離オリゴヌクレオチド。

【請求項 18】

癌の検出に使用される、請求項 14 ~ 16 のいずれか一項に記載の分離オリゴヌクレオチド。

【請求項 19】

(a) 前記生体サンプルから核酸を分離する工程と、

(b) 請求項 15 または請求項 16 のオリゴヌクレオチドプローブと前記核酸を、ハイブリッド複合体を形成することが可能である条件下でハイブリダイズする工程と、

(c) ハイブリッド複合体形成体と基準を比較する工程を含む、生体サンプルにおける CCAT-1 発現の検出方法であって、生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の比較的高いレベルはサンプルにおける CCAT-1 発現を示す検出方法。

【請求項 20】

ハイブリダイズする前に生体サンプルの転写された核酸を増幅する工程をさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

CCAT-1 またはその断片は、SEQ ID NO. 1 またはその断片と少なくとも 85% 相同性を有する分離された核酸。

【請求項 22】

SEQ ID NO. 1 またはその断片の核酸配列を含む、請求項 21 に記載の分離された核酸。

【請求項 23】

請求項 14、15、17、もしくは 18 に記載の分離オリゴヌクレオチド、請求項 16 に記載の分離オリゴヌクレオチドのプローブ、または請求項 21 もしくは 22 に記載の分離された核酸を含む、組成物。

【請求項 24】

請求項 21 または 22 に記載の分離された核酸を含むベクター。

【請求項 25】

請求項 24 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 26】

組成物は基質に付着される、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 27】

対象から得られた生体サンプルにおいて、CCAT-1 の発現レベルを測定するための少なくとも 1 種の試薬を収容するように区別されたキットであって、前記少なくとも 1 の試薬は、少なくとも CCAT-1 転写産物の断片にハイブリダイズする少なくとも 1 のオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを含むキット。

【請求項 28】

複数のセグメントを有する基質を含む配列であって、少なくとも 1 の前記セグメントは CCAT-1 またはその断片とハイブリダイズするプローブを含む配列。

【請求項 29】

10

20

30

40

50

(a) 請求項 1 5 または 1 6 に記載のプローブを投与する工程であって、前記プローブを標識プローブに接合する工程と、

(b) 前記プローブに接合する標識分子を画像化装置で検出する工程を含む、
癌または前癌病変の画像化方法。

【請求項 3 0】

前記標識分子は放射線同位体、蛍光色素、可視色素、またはナノ粒子からなる群から選択される、請求項 2 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は癌マーカー C C A T - 1、ならびに癌の診断および画像化における C C A T - 1 の使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

結腸および直腸 (C R C) の腺癌は、世界的に毎年 1 0 0 万人以上に影響を及ぼす一般的な病気である (1)。現在の C R C スクリーニングは主に便潜血検査に基づき、そして診断は結腸内視術および生検に基づく。現在のスクリーニングプログラムは C R C に関する死亡率を減少することにいくつかの効果があるが (2)、さらなる詳細なスクリーニングおよび診断方法が必要である。化学療法剤単体または標的療法との組み合わせは転移性患者の平均生存期間を改善し、C R C を完全に切除して、再発の危険性が高い患者で病気の再発を減少させた (リンパ節転移または好ましくない組織学 (3))。C R C 療法の主な進歩にも関わらず、C R C と診断された患者の約 5 0 % が診断の 5 年以内に疾患によって死亡する。

【0 0 0 3】

C R C に特異的な分子は、通常組織で発現されていなく、治療の潜在的標識となる。C R C で独自に発現される分子マーカーはわずかで、通常組織ではそれが無い。c D N A 配列を用いたマススクリーニングは、診断および治療の標識で用いることができる C R C に関連した分子マーカーを識別することに至らなかった。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 4】

本発明は癌細胞、特に結腸癌、直腸癌で特異的に発現する特有な核酸転写の識別、分離、およびシーケンシングに基づく。その特有な発現プロフィールによると、分子は結腸癌関連転写因子 1 (C C A T - 1) と呼ばれている。分子の完全な配列を本願明細書の以下で開示し、そして S E Q I D N O : 1 に規定する。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 5】

次に、C C A T - 1 は肺がんで発現することも発見した。したがって、第一の態様として、本発明は、生体サンプルにおける S E Q I D N O . 1 (C C A T - 1) またはその断片の発現レベルを測定する工程を含む癌または前癌病変を診断する方法であって、生体サンプルにおける S E Q I D N O . 1 (C C A T - 1) またはその断片の発現は癌または前癌病変を示す癌または前癌病変を診断する方法を提供する。

【0 0 0 6】

一の実施形態において、本発明は、さらに生体サンプルにおける前期発現レベルを基準と比較する方法を含み、生体サンプルにおける S E Q I D N O . 1 (C C A T - 1) またはその断片の比較的高いレベルの発現は癌または前癌病変を示す。

【0 0 0 7】

一の実施形態において、本発明は

(a) 被写体から得た生体サンプルから核酸を分離する工程と、

(b) ハイブリダイゼーション複合体が形成できる状況下で、C C A T - 1 と前記核酸

10

20

30

40

50

を認識できるプローブとハイブリッドする工程と、そして

(c) ハイブリッド複合体形成と基準とを比較する工程を含む、生体サンプルでのハイブリッド複合体は癌または前癌病変を示すことを含む診断方法である。

【0008】

他の実施形態で、本発明は、

(a) 対象から得た生体サンプルからの核酸を分離する工程と、

(b) ハイブリッド複合体の形成を可能にする状況下で、CCAT-1と前記核酸を認識できるプローブをハイブリッドさせる工程と、

(c) ハイブリッド複合体形成体を基準と比較する工程とを含み、

生体サンプルにおけるハイブリッド複合体の比較的高いレベルは癌または前癌病変を示す。

10

【0009】

他の実施形態において、本発明の方法は、

(a) 対象から得た生体サンプルから核酸を分離する工程と、

(b) 前記分離した核酸で、CCAT-1またはそのいずれかの断片を増幅する工程と、

(c) CCAT-1増幅産物を視覚化する工程と、

(d) CCAT-1増幅産物の量と基準を比較する工程とを含み、

CCAT-1増幅産物の比較的高いレベルの存在は癌または前癌病変を示す。

【0010】

特定の実施形態において、前記増幅はCCAT-1の特異的なプローブを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行う。好ましい実施形態において、前記PCRはリアルタイム定量PCRである。

20

【0011】

本発明に従って癌または前癌病変診断という用語はまた、癌または前癌病変の段階並びに生体内の画像化を含む。

【0012】

本発明の一の実施形態によると、前記基準を、癌を患っていない対象でCCAT-1の発現レベルを測定することによって決定する。

【0013】

他の実施形態において、前記基準を、前記同一の対象の非癌組織における、CCAT-1の発現レベルを測定することによって決定する。

30

【0014】

本発明の一定の実施形態によると、癌は、結腸癌、直腸癌、肺癌、およびマイクロ転移を含む前記癌の転移からなる群から選択される。

【0015】

他の実施形態によると、本発明の方法は前癌病変、腺腫性ポリープを診断する。

【0016】

本発明の一の実施形態によると、生体サンプルは組織、血液、糞便、および骨髄サンプルの群から選択される。好ましくは、前記生体サンプルは組織生検である。組織生検を例えば、結腸、直腸、肝臓、肺およびリンパ節から得ることができる。

40

【0017】

他の実施形態において、CCAT-1の発現レベルを*in situ*ハイブリッド法で測定する。

【0018】

他の態様において、本発明は、SEQ ID NO: 1 (CCAT-1)またはその相補体の少なくとも隣接した8核酸を含む分離オリゴヌクレオチドを、好ましくはプローブまたはプライマーとして使用するのためのものを提供する。

【0019】

一定の実施形態によると、本発明の分離オリゴヌクレオチドは生体サンプルにおいてC

50

C A T - 1 発現の検出での使用することを目的とする。

【 0 0 2 0 】

一定の実施形態によると、本発明の分離オリゴヌクレオチドは癌の診断での使用することを目的とする。

【 0 0 2 1 】

他の態様において、本発明は、生体サンプルにおける C C A T - 1 の発現を検出する方法であって、

(a) 前記生体サンプルから核酸を分離する工程と、

(b) 前記核酸に本発明のオリゴヌクレオチドプローブを、ハイブリッド複合体の形成を可能にする状態でハイブリッドする工程と、

(c) ハイブリッド複合体の形成体と基準を比較する工程とを含み、生体サンプルにおけるハイブリッド複合体の比較的に高いレベルはサンプルで C C A T - 1 を発現することを示すものを提供する。

【 0 0 2 2 】

一の実施形態において、前記方法はさらにハイブリッドする前に生体サンプルの転写される核酸の増幅を含む。

【 0 0 2 3 】

他の態様において、本発明は、 S E Q I D N O : 1 と少なくとも 8 5 % 相同性がある C C A T - 1 またはその断片を含む分離される核酸を提供する。一の実施形態において、分離される核酸は S E Q I D N O : 1 またはその断片を含む。一の実施形態において、核酸は m R N A である。他の実施形態において、核酸は c D N A である。

【 0 0 2 4 】

他の態様において、本発明は、上記に記載したような本発明の、分離オリゴヌクレオチドを含む、薬学的構成を含有する、組成物、分離オリゴヌクレオチドのプローブ、または分離される核酸を提供する。特定の実施形態において、組成物を基質に付着する。

【 0 0 2 5 】

本発明は、さらに本発明の分離される核酸を含むベクター、並びにベクターを含む宿主細胞を意図する。

【 0 0 2 6 】

他の態様において、本発明は、対象から得た生体サンプルにおける C C A T - 1 発現レベルを測定するために少なくとも一つの試薬を収容する区分されたキットであって、前記少なくとも一種の試薬は、少なくとも C C A T - 1 転写因子の断片にハイブリダイズする少なくとも一つのオリゴヌクレオチドのプローブまたはプライマーを含むものを提供する。

【 0 0 2 7 】

また他の態様において、本発明は複数の区域を有する基質を含む配列であって、少なくとも一種の前記区域は C C A T - 1 またはその断片をハイブリッドするプローブを含むものを提供する。

【 0 0 2 8 】

本発明はまた、腺腫様ポリープ、結腸または直腸の一次腺癌、肺癌、リンパ節転移、遠隔転移を含むがこれに限定されない癌または前癌病変の画像を、対象に C C A T - 1 が認識できるプローブを投与することにより意図するものであって、前記プローブは放射性同位元素、蛍光色素、可視染料またはナノ粒子を含むが、これに限定されない標識分子と結合する。

【 0 0 2 9 】

本発明を理解して、実際に実行する方法を参照するために、実施形態は一例として添付の図面を参照にして記載する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 0 】

【 図 1 】 図 1 は通常組織から c D N A の市販パネルにおける、 C C A T - 1 転写レベルの

10

20

30

40

50

リアルタイムPCR定量分析したグラフを示す。左の列は、結腸癌細胞系SK-CO-10でのCCAT-1転写レベルを示す。

【図2】図2は結腸癌腫（黒い棒）および隣接した通常の組織（白い棒）でCCAT-1転写レベルのリアルタイムPCR定量分析したグラフを示す。サンプル数をX軸に示す。C = コントロール / SK-CO-10。

【図3】図3はHT-29細胞が低濃度のときのCCAT-1に対する校正曲線グラフを示す図である。HT-29結腸癌細胞の増加した濃度におけるCCAT-1の増幅は、結腸癌を患っていない対象から得た末梢血単核細胞(PBMCs)で希釈する。増幅されたCCAT-1 cDNAの相対量(RQ)をy軸に示し、結腸癌を患っていない対象から得たPBMCs単独の参照サンプルを用いて算出した。CCAT-1 cDNAの相対量はHT-29腫瘍細胞濃度と相関性があった。最も低い投与量： 1×10^6 個PBMCsに腫瘍細胞5個、 1×10^6 個PBMCsに腫瘍細胞(HT29)最大500個。

【図4】図4はHT-29細胞の中間濃度の測定を示すグラフを示す図である。HT-29結腸癌細胞の増加した濃度でCCAT-1の増幅は、結腸癌を患っていない対象から得たPBMCsで希釈する。増幅されるCCAT-1 cDNAの相対量(RQ)を、結腸癌を患っていない対象から得たPBMCs単独の参照サンプルを用いて算出した。CCAT-1 cDNA(y軸)の相対量はHT-29腫瘍細胞濃度と相関性があった。最も低い投与量： 1×10^6 個PBMCsに腫瘍細胞500個、 1×10^6 個PBMCsに腫瘍細胞(HT29)最大10,000個。右の列はコントロールで、PBMCsのみである。

【図5】図5は高濃度のHT-29細胞における測定を示す。HT-29結腸癌細胞の増加した濃度でCCAT-1の増幅は、結腸癌を患っていない対象から得たPBMCsで希釈する。増幅されるCCAT-1 cDNAの相対量(RQ)をy軸に示し、結腸癌を患っていない対象から得たPBMCs単独の参照サンプルを用いて算出した。CCAT-1 cDNAの相対量はHT-29腫瘍細胞濃度と相関性がある。最も低い投与量： 1×10^6 個PBMCsに腫瘍細胞1,000個、 1×10^6 個PBMCsに腫瘍細胞(HT29)最大1,000,000個。右の列は結腸癌を患っていない対象から得たPBMCsのみから成るコントロールサンプルである。

【図6】図6は結腸腺癌由来の結腸腺腫(腺腫ポリープ)および肝転移におけるCCAT-1発現をグラフに示す。410TCO-腫瘍組織、316TCO-腫瘍組織、NN = 正常の結腸粘膜は結腸癌以外の疾患を伴う患者から得た。P1およびP2 = 結腸腺腫ポリープから得た組織。M = 肝転移(転移性結腸癌)から得た組織。

【図7】図7はヘマトキシリン・エオシン染色(H&E)、免疫組織化学(IHC)およびポリマーゼ連鎖反応(PCR)を含む、種々の検出方法によって同定した前哨リンパ節(SLNs)の割合を示したグラフである。

【図8】図8はサイトケラチン-20(CK20)の増幅プロットをリアルタイム定量PCRで示すグラフである。

【図9】図9はCCAT-1の増幅プロットをリアルタイム定量PCR(qPCR)で示すグラフである。

【図10】図10は糞便サンプルでCCAT-1の結果を示すグラフである。その結果をCCAT-1とハウスキーピング遺伝子(GAPDH)の発現との間の関係で示す。それぞれの列は同じサンプルから増幅されるGAPDH cDNAの量と比較したCCAT-1 cDNAの相対量(RQ)を示す。NTC(左の列)は結腸癌を患っていない対象から得た内在的なネガティブコントロールの末梢血リンパ球を示す。CCAT-1 cDNAは全く存在しない。サンプルt391およびt374は結腸組織のポジティブコントロールの一次性腺癌である。これらのサンプルはCCAT-1の高い発現を示す。健康な志願者からの糞便サンプル:(C46~C8)。いずれのサンプル(n=9)もCCAT-1発現は全くなかった。結腸または直腸の腺癌を有する患者の糞便サンプル(P25-P1)。4/12サンプルでCCAT-1の発現が見られた。

【図11】図11はリアルタイムPCR定量的解析で、9個のネガティブコントロール(

10

20

30

40

50

健康な志願者)の末梢血および2個のサンプルの結腸腺癌(左の列)で測定した、CCAT-1の発現を示すグラフである。

【図12】図12は結腸癌患者の末梢血サンプルで、CCAT-1の発現を示すグラフである。増幅されるCCAT-1 cDNAの相対量(RQ; y軸に示す)は結腸癌(NC)を患っていない対象から得たPBMCsのコントロールサンプルと比較した。

【図13】図13は18種の結腸直腸癌細胞株における相対的なCCAT-1の発現をHT-29と比較して示すグラフである。発現レベルはリアルタイム(定量的)PCRで測定した。いずれかの特定サンプルで相対的CCAT-1発現を、HT-29直腸癌細胞株(=1)におけるCCAT-1発現と比較した。

【図14】図14は16種の肺癌細胞株における相対的なCCAT-1の発現をHT-29と比較して示すグラフである。発現レベルをリアルタイム(定量的)PCRで測定した。いずれかの特定サンプルで相対的CCAT-1発現を、HT-29直腸癌細胞株(=1)におけるCCAT-1発現と比較した。

【図15】図15Aはin-situプローブ(SEQ ID NO: X)として用いられる、165bp核酸配列を示す。図15BはpBluescriptベクターのノーザンブロット分析を示す写真である。レーン1:ラダー。レーン2:pBluescriptベクターとインサート部位。

【図16】図16はスクリーニングに基づくIn situハイブリダイゼーションの例示である。結腸腺癌(a)および隣接した正常粘膜(b)におけるCCAT-1の相対的染色。隣接した正常粘膜におけるCCAT-1染色の低い濃度と比較して、腫瘍組織(a)では強いCCAT-1の染色が見られた。

【図17】図17は健康な志願者の末梢血サンプルにおけるCCAT-1の発現を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0031】

定義

本願明細書では、「CCAT-1」という用語は結腸癌の関連転写産物1(Colon Cancer Associated Transcript 1)を指す。

【0032】

本願明細書では、「CCAT-1の断片」または「CCAT-1転写産物の断片」はCCAT-1遺伝子転写産物の断片であり、オリゴヌクレオチドまたは核酸プローブ、プライマーまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドとして役立つことができる。

【0033】

本願明細書では、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」を同じ意味で使い、そしていかなる長さのヌクレオチドのポリマーの形態で、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、またはその類似体を含む。以下は制限しないポリヌクレオチドの例:遺伝子または遺伝子断片、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA(tRNA)、リボソームRNA(rRNA)、リボザイム、cDNA、組み換え型ポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、いずれの配列の分離されるDNA、いずれの配列の分離されるRNA、核酸プローブ、プライマーである。ポリヌクレオチドは、例えばメチル化されるヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体のような、修飾したヌクレオチドを含むことができる。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分で隔てられることができる。ポリヌクレオチドはポリメリゼーション後、例えば標識成分との結合によってさらに修飾することができる。用語はまた、二重鎖および一重鎖の分子の両方を含む。

【0034】

CCAT-1に関する「相補的転写」または「プローブ」は、核酸分子またはそれとの相補的配列をいい、少なくともCCAT-1のcDNAまたはmRNAの存在を検出するために使用した。検出をプローブと分析配列との間のハイブリッド複合体の同定によって行う。プローブは固体支持体または検出可能なラベルに付着することができる。プローブ

10

20

30

40

50

は通常一重鎖であるだろう。(複数の)プローブは通常10から20ヌクレオチドを含む。プローブの特有の性質は、特定のな使用に依存して、決定する当業者の能力の範囲内である。通常、非常に厳しい条件化でプローブはCCAT-1のcDNAまたはmRNAの少なくとも一部とハイブリダイズするだろう。

【0035】

本願明細書では、「プライマー」とは、標的、または標的とハイブリッドして、その後標的と相補的なポリヌクレオチドとポリメライゼーションを促進することによって関連のサンプルに存在する「鋳型」標的に結合する短いポリヌクレオチドを指す。

【0036】

「ポリメラーゼ連鎖反応」(PCR)は、プライマーセット、通常フォワードプライマーとバックワードプライマーから成るプライマーの対と、ポリメライゼーションの触媒としてDNAポリメラーゼとを用いて標的ポリヌクレオチドとして、複製コピーを作製する反応である。

10

【0037】

プライマーはまた、例えば下記に記載したサザンまたはノーザンブロット解析のような、ハイブリッド形成反応でプローブとして使うことができることを理解すべきである(Sambrook J. et al: A Laboratory Manual, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989)。

20

【0038】

本願明細書では、用語「cDNA」は、相補的DNAを指す。「cDNA」は分離されるポリヌクレオチド、核酸分子、またはいずれかの断片もしくはその相補物を指す。それは組み換え技術または合成から始まり、二重鎖または一重鎖で、5'および3'配列のコーディングおよび/または非コーディングを表す。本願明細書では、「結腸癌」または「CRC」は盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸、S状結腸および直腸を含む腸管細胞の癌によって特徴付けられる医学的状態を指す。

【0039】

本願明細書では、「前癌病変」または「腺腫性ポリープ」は、基底膜内に浸潤している組織学的証拠がない結腸粘膜の悪性転換によって特徴付けられる医学的状態を指す。

30

【0040】

本願明細書では、「肺癌」は肺細胞癌によって特徴付けられる医学的状態を指す。

【0041】

「ベクター」は、インサートポリヌクレオチドを宿主細胞内で転写する自己複製の核酸分子を含む。この用語は細胞内で核酸分子のインサートで主に機能するベクター、主に核酸の複製で主に機能する複製ベクター、およびDNAまたはRNAの転写および/または翻訳で機能する発現ベクターを含むことを意図する。また1つ以上の上記機能を備えるベクターを意図する。

【0042】

「宿主細胞」という用語はベクター、または例えばポリヌクレオチドのような外因生の核酸分子の結合に対する受容体として役割を果たす個々の細胞、または細胞培養を含む。特に、宿主細胞は少なくともCCAT-1の一部を含むベクターに対する受容体として役割を果たすことができる細胞を含む。それはまた、場合によっては、その遺伝子型または表現型で本来の親細胞に、自然、事故的、または故意の突然変異による必ずしも同一でない子孫細胞を含む。原核細胞または真核細胞は本発明における宿主細胞として役割を果たすのに適している。宿主細胞は、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、ネズミ、ラット、サルまたはヒト細胞のような哺乳類細胞を含む動物細胞を含むが、これに限定されない。

40

【0043】

本願明細書では、「差次的発現」とは、生体サンプルで転写されたオリゴヌクレオチド(例えばmRNA)の量の欠乏、存在、または変動から検出される遺伝子発現の上昇、さ

50

らに高い（発現上昇または存在）、または減少（発現低下または欠乏）を指す。「比較的高い発現レベル」とはコントロールサンプルまたは基準で検出される発現レベルより少なくとも2倍、2.5倍、3倍、5倍、10倍、またはそれ以上である発現レベルを含む。この用語はまた、細胞または組織で核酸配列の発現を指す一方、発現が全くないことをコントロール細胞で検出した。

【0044】

本願明細書では、「ハイブリダイゼーション」とは、少なくとも1つのポリヌクレチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基との間で水素結合により安定化する複合体を形成する反応を指す。水素結合はワトソン・クリック型塩基対により、いずれかの配列特異的な方法で起こる。ハイブリダイゼーション反応は例えばPCR反応開始といった比較的広範囲な処理で工程を構成する。

10

【0045】

ハイブリダイゼーション反応は種々の厳密な状況下で行うことができる。厳密な状況で、互いに少なくとも60%、65%、70%、75%同一の核酸分子は、互いにハイブリッドしたままである。非常に厳密なハイブリダイゼーション状況下の非制限的な例は、約45で6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SCC)でハイブリダイゼーションを行い、その後50、55、または60またはそれ以上の0.2×SSCおよび0.1%SDSで一回以上洗浄する。

【0046】

ハイブリダイゼーションが逆平行の構成で、2本の一重鎖ポリヌクレオチドの間で起こるとき、それらのポリヌクレオチドは相補的であるといわれる。

20

【0047】

本発明の核酸分子SEQ NO: 1(CCAT)とハイブリダイゼーションができる分子はまた、それにハイブリダイズできるポリヌクレオチド断片を含む。ここで、断片はCCAT-1転写産物とハイブリッドするのに十分な長さである核酸分子の一部という意味で理解されている。したがって、断片という用語は、これらの分子の配列がCCAT-1転写産物配列と一以上の位置で異なり、そしてこれらの配列またはその一部と高い割合で相同性を示していることを意味する。この文脈において、相同性とは、少なくとも40%、特に少なくとも60%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または95%を超える同一性がある配列を意味する。

30

【0048】

好ましくは、相同性の度合いは、それぞれの配列を核酸配列SEQ ID NO: 1と比較して確定される。このような場合、比較される配列は同じ長さを有していなく、好ましくは相同性の度合いは、比較的長い配列の核酸残渣と同一である比較的短い配列のヌクレオチド残渣の割合をいう。相同性または同一性の度合いは、ヨーロッパ生物情報学研究所(EBI)およびヨーロッパ分子生物研究所(EMBL)で配布されている例えばClustalWといった周知のコンピューター配列に基づくプログラムによって評価する。ClustalWは例えば、www.ebi.ac.uk/clustalwといった様々な情報源からダウンロードできる。ClustalWパッケージバージョン2.0を使用して特定の配列であるかどうか決めるときは、例えば、本発明のSEQ NO: 1と85%相同性がある、比較はそこで提供されるデフォルト設定の条件で行われる。

40

【0049】

「生体サンプル」を広い意味で本願明細書において使用して、体液；細胞調製の可溶性分画、または細胞を成長させる培養液のアリコート；細胞から分離または抽出された染色体、細胞小器官または膜；液体の中または基質に付着されるゲノムDNA、RNA、またはcDNA；細胞；腫瘍組織、結腸直腸サンプルおよび非結腸直腸サンプルを含む生検、組織；組織プリント；指紋、頬側細胞、皮膚または髪；およびその他を含むことができる。

【0050】

「基質」とは核酸が結合する固定または半固定される支持体をいい、そして膜、フィル

50

ター、チップ、スライド、ウェーハー、繊維、磁性または非磁性のビーズ、ゲル、キャピラリーまたは他の管、プレート、ポリマー、ナノ粒子および微粒子と、溝、栓、水管および孔を含む様々な表層形を含む。

【0051】

本発明は、結腸癌関連転写産物 1 (C C A T - 1)、2528塩基対 (b p) の長さである新規非コードRNA、および染色体の8q 24.21に位置する新規非コードRNAの同定に基づく。

【0052】

C C A T - 1は結腸、直腸、肺癌、および結腸の中の前癌病変 (腺腫ポリープ) を含む様々な癌組織および細胞株に存在するが、仮にあったとしても本願明細書に記載される通常組織において、とても低いレベルで検出されたことが発明者によって見つめられた。したがってC C A T - 1は癌細胞標識として役立ち、そして特に生体サンプルで結腸直腸、肺癌、および前癌病変 (腺腫ポリープ) の同定に有効である。

【0053】

したがって、本発明はC C A T - 1またはその配列のいずれか一部の使用を特定分子診断標識として、結腸直腸癌 (C R C)、前癌病変 (腺腫ポリープ) および肺癌で患者の診断、病期診断 (病理学的診断)、画像化、および手術後の査察として提供する。

【0054】

これらの活性は生体外または生体内で組成物の伝達によって患者の腫瘍で映像化するために実行することができる。

【0055】

検出はポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、in-situハイブリダイゼーション技法、または公知の他の検出方法を用いて成し遂げることができる。

【0056】

本発明のいくつかの実施形態によると、組成物および方法を、C C A T - 1発現の証拠を検証するために、患者および/または患者のサンプルを検査、診断、および分析で提供する。C C A T - 1の発現は一次性もしくは転移性の結腸直腸癌、または一次性もしくは転移性の肺癌を示唆する。本発明のさらなる態様において、組成物および方法は、一次性もしくは転移性の結腸直腸癌、または一次性もしくは転移性の肺癌細胞を視覚化するのに実用的であるものを提供する。

【0057】

検査および診断の組成物および方法は、結腸直腸癌の高リスク群である個人のモニタリング、例えば、過去に局所疾患、転移性疾患と診断されたもの、または疾患に遺伝的に関連したもの、または過去に癌と診断された一次的および二次的段階の家族の一員を有するもので使用することができる。例えば潰瘍性大腸炎またはクローン大腸炎のような結腸の炎症状態の病歴を持つ個人および煙草喫煙の経歴を持つ個人は、結腸直腸または肺癌の高いリスク群である個人と考えられる。生体内検査ならびに診断の組成物および方法は、結腸直腸または肺癌を患っているまたは治療された個人を診断する際に、癌が取り除かれたかどうかを確定するために使用する。検査ならびに診断の組成物および方法は、例えば遺伝学的検査および/または家族の病歴などの遺伝的素因として識別された個人の監視に用いることができる。

【0058】

したがって、結腸直腸および肺の癌を発現するリスクがある個人を識別することができ、サンプルはこのような個人から分離することができる。本発明は、少なくとも1つの癌の徴候または特徴、例えば関連のある組織でポリープの存在を示す個人を診断するのに実用的である。本発明は、結腸直腸または肺の癌を患う親類を含む家族に病歴を有すると識別された個人を検査するのに特に実用的である。同様に、本発明は治療、腫瘍を摘出、または回復を感じている個人での検査に特に実用的である。

【0059】

本発明によると、化合物はC C A T - 1遺伝子転写産物と結合するものを提供する。

10

20

30

40

50

【0060】

結腸、大腸、または肺の癌の発見は癌患者または癌の疑いのある個人から得られるいずれかの生体サンプル、組織、血液、骨髄、糞便、尿、リンパ節、またはいずれかの体液を含むが制限されないものを用いて行われる。特定の実施形態において、生体サンプルは癌とみなされる組織から得た生検（例えば、針生検または結腸内手術時に除去された組織）である。特定の実施形態では、サンプルは糞便サンプルである。

【0061】

組織サンプルは外科技術によって得られる。当業者は本発明による分析および検査で得ることができる複数のテストサンプルを正しく評価する。さらに、当業者は、本発明が組織サンプルを得る目的で更なる手法を使用できることを理解する。

10

【0062】

一の実施形態では、血液を生体サンプルとして用いる。この場合、その中に構成される細胞は、例えば遠心分離によって、血液サンプルから分離することができる。

【0063】

好ましい実施形態では、生体サンプルをヒトから得る。

【0064】

いずれかの生体サンプルにおけるCCAT-1遺伝子転写物の存在を検出することは、生体サンプルが腫瘍細胞を含有することを示唆する。

【0065】

組織サンプルを、例えば、超音波処理、物理的な拡散または化学的溶解といった標準の技術で任意に均質にした。

20

【0066】

外科病理学のための組織断面の調製は、凍結して、標準の技術を用いて調製できる。組織断片の*in situ*ハイブリダイゼーション分析を固定し細胞で行う。

【0067】

CCAT-1遺伝子転写産物の存在を、様々な公知技術、例えば、特異的なプライマーおよび増幅される産物の検出を用いて遺伝子転写産物またはその断片のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、およびCCAT-1に特異的なプローブとハイブリダイゼーションを使用して確定する。

【0068】

CCAT-1遺伝子転写産物の存在はまた、例えば*in situ*ハイブリダイゼーションの技術を用いて組織断片から確定できる。

30

【0069】

そのためには、本発明は、本発明の手順でCCAT-1を識別するために用いたオリゴヌクレオチドプローブおよびオリゴヌクレオチドプライマーを提供する。

【0070】

他の態様において、本発明はこのような部分としてオリゴヌクレオチドプローブおよびオリゴヌクレオチドプライマーを含むキットを提供する。本願明細書で提供した例は本発明の範囲を制限することを意味しないことを認識すべきである。

【0071】

上記のように、生体サンプルにおけるCCAT-1遺伝子転写産物を検出することはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術を用いて実行することができる。PCRは従来技術において知られていて、そして診断および研究の両方で通常実践されている。例えばそれは米国特許4,683,202号および5,075,216号で開示される。要約すると、PCRはDNA/RNA配列の増幅を、増幅すべき標的核酸配列とハイブリダイズするプライマーを与えることによって提供する。プライマーセットは、通常2つのプライマー（+フォワードおよび-バックワード）を含む。反応はまたヌクレオチドおよびポリメラーゼ酵素を使用する。ポリメラーゼはハイブリダイズされるプライマーと隣接した配列に従って、相補的なヌクレオチドを満たす。増幅サイクルは所望の産物の急速な増幅を生じる。

40

50

【0072】

PCRプライマーは配列情報の基礎に通常のプロトコールに従って設計する。CCAT-1転写産物の核酸配列をSEQ ID NO: 1に記載する。

【0073】

PCRのために、RNAは、通常生体サンプルの細胞から抽出して、分析、あるいはcDNAに変換する。このような変換はまた通常の実務である。

【0074】

CCAT-1転写産物が生体サンプルに存在するとき、PCRはCCAT-1転写産物を含む元のmRNAを急速な複製といった結果になる。

【0075】

CCAT-1が欠乏しているとき、PCRは検出可能な増幅産物を生じないだろう。PCRに適したプライマーは、通常8~25塩基長、15~30塩基長、または18~50塩基長である。典型的なプライマーは15~25塩基を含む。これらのプライマーはCCAT-1転写産物またはその対応するcDNAと同一または相補的である。これは、これらのプライマーがCCAT-1転写産物またはその断片にハイブリダイズする理由である。

【0076】

生体サンプルから以前に得られたmRNAまたはそのcDNAをプライマー、ヌクレオチドおよびポリメラーゼ酵素と混合して、既知のPCRプロトコールに従った。混合物は一連の温度サイクルを受ける。CCAT-1転写産物またはそれに対応するcDNAが混合物に存在して、プライマーはハイブリダイズして、CCAT-1転写産物は急速に増幅される。CCAT-1転写産物が欠乏しているとき、全く検出できない増幅を認めた。増幅産物は例えばゲル電気泳動といった、従来技術において多くの手法によって検出できる。

【0077】

PCRは、少量の転写されたポリヌクレオチドを生体サンプルから回収するときに好ましい。

【0078】

さらに本発明はCCAT-1転写産物を増幅することを目的としたPCR反応に適したポリヌクレオチドプライマーを提供する。

【0079】

本発明によると、生体サンプル内のCCAT-1転写産物の存在の検出に役立つ診断キットとしてまとめられる。このような診断キットはCCAT-1を検出するのに適した試薬を含む。制限しない例として、このようなキットは、少なくとも一種のオリゴヌクレオチドプローブおよび/または少なくとも一種のオリゴヌクレオチドプライマーを含む。通常、本発明のキットは、使用した試薬の容器をさらに含む。さらに、これらのキットは検出した核酸の大きさを測定するためにゲル分析で使用するヌクレオチドサイズマーカーを含む。本発明のキットは分析を行うための説明書とプロトコールをさらに含む。ポジティブおよびネガティブのコントロールを、組み立てキットの一部としてさらに提供することができる。

【0080】

他の実施形態では、サンプルがCCAT-1を発現する細胞を含有するサンプルかどうかの決定を、生体サンプルから抽出したmRNAのノーザンブロットング分析で確定する。ノーザンブロットング分析は当業者に既知の方法である。例えば、Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 参照。

【0081】

さらに、mRNA抽出、電気泳動によるmRNA分離、プロット分析、プローブおよび

10

20

30

40

50

プライマー調製ならびにハイブリダイゼーション技術が既知で、そしてこれらの技術を実施するための材料は市販である。

【0082】

メッセンジャーRNAを、例えば、ポリdTカラムを用いて抽出でき、そして材料を電気泳動で分離して、例えば、ニトロセルロース紙に転写する。

【0083】

ラベルしたプローブは、紙に固定したmRNAの存在を可視化するために一般的に用いられる。これらのプローブはCCAT-1転写因子またはその断片に相補的である核酸配列を有する。

【0084】

そのために、SEQ ID NO: 1における配列情報を、プローブを調製、またはCCAT-1転写産物を分離および複製するために使用する。このようなプローブは少なくとも8、15、30、40、または100塩基配列伸縮である。プローブはDNAまたはRNAであることができ、それは好ましくは一重鎖で、一般的にはSEQ ID NO: 1に対応する断片に配列の相同性が少なくとも65%有する。

【0085】

プローブを、オリゴラベリング、またはレポーター分子が存在する場合はPCR増幅で作成することができる。CCAT-1またはその断片のcDNAを含有するベクターを、例えば、RNAポリメラーゼおよび標識したヌクレオチドを加えて、メッセンジャーRNAプローブを作成するために使用することができる。当業者はこれらの手法を市販のキットと材料で実行することができる。

【0086】

ハイブリダイゼーションの厳格さは、例えばプローブの中のGC容量、温度、および塩濃度といった様々な要因によって確定される。特に、厳格さは塩濃度の減少またはハイブリダイゼーション温度の上昇によって増加することができる。高い厳格さで、ハイブリダイゼーション複合体は、核酸が非常に相補性ある場合にのみで安定を保てるだろう。

【0087】

ハイブリダイゼーションに関する条件は、上記のように、例えばSambrook等の、等業者に周知である。

【0088】

従って本発明のキットは、生体サンプルにおけるCCAT-1転写産物の存在を検出するためのノーザンブロット技術を実施するために実用的な試薬を含むことができる。キットは、任意に、転写されたCCAT-1またはその断片にハイブリダイゼーションするためのプローブとして使用することができるオリゴヌクレオチドを含む。プローブは放射性同位元素で識別することができる。ポジティブおよびネガティブのコントロールまた、適切なサイズマーカーと共に任意に提供することができる。

【0089】

CCAT-1転写産物の存在を検出するための他の技術は、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによる。ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションは等業者に既知である。この方法はまたCCAT-1転写産物の核酸配列にハイブリダイズする特異的な核酸配列検出プローブを使用する。

【0090】

生体サンプルからのRNAを、一般的にフィルター紙またはその他に固定する。プローブを加えて、プローブが固定材料を適度に相補する場合にのみ、ハイブリダイゼーションを可能にする状態に保持する。

【0091】

これらの条件は、固定材料にハイブリダイズするプローブを部分的に洗浄するために十分に厳しくすべきである。フィルター上でプローブの検出は、CCAT-1転写産物の存在を示す。

【0092】

10

20

30

40

50

ハイブリダイゼーション分析のためのプローブは、C C A T - 1 遺伝子転写産物の配列に相補的な少なくとも 8、12、15、20、30、50 または 100 塩基を含む。

【0093】

SEQ ID NO: 1 に開示した配列情報を、等業者によって使用して本発明のプローブを調製することができる。ハイブリダイゼーション方法に関する条件は、サンプルにおける十分に相補的でないポリヌクレオチドを生じるバックグラウンド信号を最小限にすることで最適化できる。

【0094】

従って、本発明はさらにオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションに関するプローブとして実用的である標識されたオリゴヌクレオチドを含む。ラベルされたプローブは放射性標識ヌクレオチド、またもう一方で、容易に利用できる系による検出できるプローブを含む。ラベルされたプローブは一般的に、分光器、光化学、生化学、免疫化学、または化学の手段によって測定できるラベルを組み込む。制限しない例によって、このようなラベルは放射性物質 (^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{125}I)、蛍光色素 (ジゴキシゲニン、フルオレセイン、5 - プロモデソキシウリジン、アセチルアミノフルオレン)、ビオチン、ナノ粒子などを含むことができる。このようなオリゴヌクレオチドを、通常これらの 3' から 5' 末端でラベルする。

10

【0095】

特に、C C A T - 1 に相補的な転写産物 (例えば SEQ ID No: 4) またはその配列のいずれかの部分を、生体外もしくは生体内の検出、または結腸もしくは直腸の癌、および肺癌の映像化のために、可視領域 (例えば、CY 3.0 または CY 5.0) の蛍光タグまたは赤外領域 (例えば Cy 5.5) のプローブを含むが、これに制限されない蛍光プローブと結合することができる。さらに、C C A T - 1 またはその配列のいずれかの部分に相補的な転写産物を、ナノ分子、微粒子、リボソームに、癌の検出または映像化のために接合または組み込むことができる。

20

【0096】

C C A T - 1 またはその配列のいずれか部分に相補的な転写産物は、癌の検出または映像化のため、放射線同位元素に接合する。C C A T - 1 またはその配列のいずれかの部分に相補的な転写産物は、癌の検出または映像化のために、合成ポリマーに接合する。

【0097】

C C A T - 1 またはその配列のいずれかの部分に相補的な転写産物は、癌の検出または映像化のために、抗体、毒素、または他のペプチドを含むが、これに制限されない他の生物学的物質と接合する。

30

【0098】

キットは、本発明のハイブリダイゼーション方法を実施するために役立つものを集めることができる。これらのキットは、さらに C C A T - 1 転写産物にハイブリダイズする標識されたオリゴヌクレオチドを提供する。一の実施形態において、ラベルされたプローブは放射性標識である。ポジティブおよびネガティブのコントロールは、さらに前記キット並びに例えばポリヌクレオチドラダーといったサイズマーカーを含むことができる。これらのキットはさらに分析を行うための説明書を含むことができる。

40

【0099】

本発明のハイブリダイゼーション技術は、例えば組織断片といった生体サンプルで、C C A T - 1 を発現する細胞をさらに検出するために *in situ* ハイブリダイゼーションを含む。したがって、本発明は、さらに *in situ* ハイブリダイゼーションに実用的であるプローブに関する。これらのプローブを生体サンプルに存在する相補的な核酸配列とハイブリダイズするように設計する。蛍光顕微鏡を、蛍光マーカーで標識されたプローブを可視化するために利用することができる。

【0100】

そのためには、本発明はまた、*in situ* ハイブリダイゼーションを実施するためのキットを提供する。*in situ* ハイブリダイゼーションを使用して組織断片で C C

50

A T - 1 配列の m R N A を検出することができる。蛍光マーカーを使用して、C C A T - 1 転写産物またはその相補的な配列と対応する配列を検出することができる。

【 0 1 0 1 】

本発明は、さらに C C A T - 1 遺伝子転写産物、その断片、またはその相補体を含む発現ベクターを含有する組み換えベクターに関する。

【 0 1 0 2 】

本発明は、さらにこのようなベクターを含む宿主細胞、およびこのような組み換え細胞を使用する C C A T - 1 を発現する方法に関する。宿主細胞の例は、例えば S . セレピシエといった酵母細胞、例えば S . フルギペルダといった昆虫細胞、例えば大腸菌といった細菌、およびチャイニーズハムスター卵巣細胞といった哺乳類細胞を含む。

10

【 0 1 0 3 】

本発明はまた、C C A T - 1 遺伝子転写産物 (S E Q I D N O : 1) またはその断片の配列を含む、分離されるオリゴヌクレオチドを提供するためである。特に、本発明は、S E Q I D N O : 1 と少なくとも 8 5 % 相関を有する分離されたオリゴヌクレオチドに向ける。

【 0 1 0 4 】

本発明の組み換え発現ベクターは、本発明の分離されるオリゴヌクレオチドの調製のための組み換え発現系を調製するために宿主の形質転換が実用的である。発現ベクターは転写制御要素 (例えば、プロモーターおよびエンハンサー) を含むことができる。これらの要素を、特定の宿主において、それらの効率で選択される様々な供与源から選択することができる。ベクター、c D N A、および調節エレメントは、組み換え D N A 技術または合成技術を用いて組み合わせる。

20

【 0 1 0 5 】

等業者は、本発明の C C A T - 1 ポリヌクレオチドを含むこのような分子を、例えば本願明細書に記載したもののような周知の発現系で用いる市販の発現ベクターの使用によって導入することができる。

【 0 1 0 6 】

組み換え技術によるこれらポリヌクレオチド分子の作成に加えて、自動核酸合成をまた C C A T - 1 またはその断片の作成に用いることができる。このような技術は当業者の通常の技術を有するものにとって周知である。

30

【 0 1 0 7 】

上述したいずれかの C C A T - 1 転写産物、C C A T - 1 に対応する c D N A s、その断片、オリゴヌクレオチド、相補的 R N A および D N A 分子、更には P N A s を、使用して、差次的 C C A T - 1 の発現を検出または測定することができ、発現レベルを増加させる。これらの測定は、療的介入の間に m R N A レベルを観測できる。それはまた、本発明の診断法、実際には予後の測定に活用することができる。これらの測定はまた、例えば C R C または肺癌のような癌組織を分類するのに利用することができる。

【 0 1 0 8 】

差次的発現に関連のある癌は、特異的な結腸または直腸の癌並びに肺癌を含む。診断分析は、上記のようなハイブリダイゼーションまたは増幅技術を用いることができる。それらは患者から通常サンプルまで得られた生体サンプルで、遺伝子の差次的発現または C C A T - 1 の発現レベルの増加を検出するために、遺伝子発現を比較することを利用することができる。この比較に関する定量的方法は等業者に公知である。特に、定量 P C R (q P C R) またはリアルタイム定量 P C R (R T - q P C R) 分析を使用して、生体サンプルから C C A T - 1 発現レベルを定量化することができる。要するに、リアルタイム定量的 P C R は、増幅過程にわたって同時に観測することを設ける。増幅産物を、進行が続いて蓄積しながら、絶え間なく検出する。定量的 P C R および R T - q P C R は等業者に既知の手法である。

40

【 0 1 0 9 】

制限しない例として、ラベルされたプローブを、患者から得た生体サンプルから調製し

50

た核酸と混合することができる。混合物を、ハイブリダイゼーション複合体の形成のための状態で維持する。特定の培養後に、サンプルを洗浄して、ハイブリダイゼーション複合体に関するシグナル量を定量化した。このシグナルをまた基準値と比較することができる。通常基準と比較して個人から得た生体サンプルにおける C C A T - 1 の比較的高い信号シグナルは、癌（例えば C R C または肺癌）を示す。

【 0 1 1 0 】

識別的発現の設定または C C A T - 1 の増加した発現に関する基準を設けるために、正常および疾患での発現レベルを評価した。正常の対象から得た核酸サンプルを、ハイブリダイゼーションが可能である条件下で、C C A T - 1 と相補的なオリゴヌクレオチドプローブと反応させる。その後、ハイブリダイゼーション複合体の量を測定した。この様に得た基準値を、検査した個人の生体サンプルから得た値と比較することができる。

10

【 0 1 1 1 】

基準レベルを、癌を患っていない個人で、C C A T - 1 発現を測定して確定することができる（「正常の対象」という）。あるいは、標準レベルを生体サンプル参照遺伝子、任意に検査した個人の発現レベルに従って確定することができる。参照遺伝子を、例えば本願明細書で例証したようなハウスキーピング遺伝子（例えば G A P D H ）であることができる。したがって生体サンプルにおける差次的 C C A T - 1 発現は、参照遺伝子の発現レベルと比較した C C A T - 1 発現の比率の増加、またそれ以外で標準化された C C A T - 1 発現の測定の増加によって識別することができる。

20

【 0 1 1 2 】

基準をまた、組織の C C A T - 1 レベルを癌がない（「非癌組織」または「正常の組織」とも称する）と考慮した周囲の組織との比較によって確定することができる。

【 0 1 1 3 】

いくつかの実施形態において、本発明の C C A T - 1 プライマーおよび/またはプローブを、液体、溶液、懸濁液、乳液または凍結乾燥粉末を含む様々な形態で形成することができる。

【 0 1 1 4 】

他の態様において、本発明は複数のセグメントを有する基質を含むオリゴヌクレオチドの配列であって、少なくとも1種の前記セグメントは C C A T - 1 またはその断片とハイブリダイズするプローブを含むものを提供する。特定の実施態様において、配列は例えば、S E Q I D N O : 5 といった本発明のプローブを含む。

30

【実施例】

【 0 1 1 5 】

以下に提供した実施例は、本発明を例示して、発明の要旨の範囲を制限することを目的としない。

【 0 1 1 6 】

実施例 1 : C C A T - 1 の発見

患者、細胞株、組織および R N A

結腸癌細胞株 H T - 2 9 および S K - C O - 1 0 を A T C C (M a n a s s a s , V A) から得た。H T 2 9 を使用して、差次的発現分析 (R D A) 装置で、テスター R N A を調製した。結腸腺癌および隣接した正常の組織試料を、L u d w i g I n s t i t u t e (# 4 t o 2 9) または H a d a s s a h - H e b r e w U n i v e r s i t y M e d i c a l C e n t e r (# 9 6 - 2 1 8) によって保持した組織貯蔵所のいずれかから得た。全てのサンプルは外科的腫瘍切除を受けた患者からのものであり、I n s t i t u t i o n a l R e v i e w B o a r d (I R B) の承認を得た書面での告知に基づく同意の書面に署名した患者である。全 R N A を、グアニジウムイソチオシアナート / C s C l 勾配精製方法または T r i z o l 試薬 (S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s , M O) のいずれかから得た。正常組織の R N A のパネルを、C l o n t e c h (M o u n t a i n v i e w , C A) から得た。

40

【 0 1 1 7 】

50

R D A および c D N A のクローニング

差次的発現分析 (R D A) を前述したように行った (4) 。 H T 2 9 はテスター R N A を構成する。ドライバーのために、R N A を 3 種の正常結腸組織から混合した。T s p 5 0 9 I または D p n I I を制限エンドヌークレアーゼとして利用して、3 回の増幅を実施した。

2、3 回の増幅サイクルの後に生成されたフラグメントを分離して、配列を決定した。R D A によって識別した部分的な長さの C C A T - 1 の転写産物を使用して、c D N A の全長を得た - Z A P I I ベクター系 (S t r a t a g e n e , L a J o l l i a , C A) で、H T 2 9 c D N A ライブラリーを評価した。

【 0 1 1 8 】

10

C C A T - 1 遺伝子転写産物と発現

H T 2 9 c D N A ライブラリーから複製される全長の C C A T - 1 c D N A は 2 5 2 8 b p 長さである。転写産物を、2 つの染色体 8 ゲノムクローンに対する (A C 0 2 7 5 3 1 a n d A C 0 2 0 6 8 8) B L A S T 分析により示すように、n t s . 1 - 1 9 4 および 1 9 5 - 2 5 2 8 にわたる 2 つのエクソンに、約 9 k b の長いイントロンで示す。c D N A は A K 1 2 5 3 1 0 と同一であり、テラトカーシノマ (5) と識別された。A K 1 2 5 3 1 0 と比較して、C C A T - 1 はその 5 ' 末端で 8 6 塩基を欠損し、3 ' 末端で 3 1 3 の付加を有する。

【 0 1 1 9 】

C C A T - 1 (S E Q I D N O . 1) の全配列は下記に示す :

20

```

GCCTTAATAGCTAGCTGGATGAATGTTTAACTTCTAGGCCAGGCACT
ACTCTGTCCCAACAATAAGCCCTGTACATTGGGAAAGGTGCCGAGACATGAAC
TTTGGTCTTCTCTGCAATCCATCTGGAGCATTCACTGACAACATCGACTITGAA
GTTGCACTGACCTGGCCAGCCCTGCCACTTACCAGGTTGGCTCTGTATGGCTA
AGCGTTTTCTCCTAAAATCCCTTGAAAACCTGTGAGAAGACCATAAGAAGATCA
TATCTTTAATTCTATTTTACAAGTCACACAATATTCCAATCAAATACAGATGGT
TGAGAAAAGTCATCCATCTTCCCTCCCCACCCCTCCACAGCCCCTCAACCACT
GCCCTGAAACTTATATGCTGTTATCCGCAGCTCCATCTGGAGCATCACAGCTA
CTGTCAACCCTGACGCTCTTTCTGAAAAACACCGGATGGACATCAGAACTAT
TTCTTTAAGGATGTTACTGAGCCACACAGGAAAACCTTGCCTTATGATTTTGAAT
GCACGGATCTGATTTGACTAAACATGATAACTAGAGAATCACCCAATCTACTC
CCATTTTCAACTCTAAATCATCAGAGTGTCTCAAATCCAAAGCACACACAGAC
CAGCCTGGCCAACACGGTGAAACTCCACCCCTACTAAAAGTATAAAAATTATC
CAGGTGTGGTGGCGGGCGCCTGTAATCCAAGCTACTTGGGAGTCTGGAGGCA
GGAGAATCCCTTGAACTGGGAGATGGAGGTTGCAGTGAGCAGAGATCACAC
CACCGCACTCTAGCCTGGGCCACAAATCAACAACAACAACAACAACAAAAA
CAAAGCGCACACAGAGACTGAGGTCCCTCTTTGGCATTGAGAAGATGGCTATGC
AAGTCCCAACTAGCAAGTGCAAACCTTCCAGCTTCACTTCTGCCAGTGTCCCTT
CACCCCTTCTCAACCCCACTGGGAGGCAGGAGGGTGCTTGACAATAACAGCCT
TGGCATCACTCTGCCAGGGTGTAATAGGAACTGTTACAATTCTGAGATTCTGT

```

30

40

GTAAGCACTGGCCTTTCTGCCTAGAATGCCTTCTCCTCTCTTTTTTAACTGCAT
 GCTCCTATTTATCTTTCAAAGCCCGGAAAAATAACTGACACCGGAAATG
 CTCCCTTCTACTGCAGTCATTTAGATGACTCTATGCCATTCCATTCTCTCT
 TTCTACCACAGAAGTGCTTTGAGATTTTGGAGTCAGACTGCTTGAAGTTGAA
 TCCTGGCCCTCTCATCAGAGACTTGACTTATTTTAGGCAAGTTATATAACCAAT
 TTTACCTCAGTTCCTTACCCATAAAATGGGTCTAATGAGAGTACCTACCACAC
 AGAATTTTGATGAAAACTGAATGAGATGAAGGCCTTTAAGGCAGTGGTCCCCA
 ACCCTGGGGACACAGACAGGTACCATTTTGTGGCCTGTTAGGAACTGGGCCAC
 ACAGCAGGAGGTGAGCAGTGGGTGAGTGAGATCAGCGTTATTTACAGCTGCT
 CCCCATTGCTCACCTTACTGCCTGAGCTCCACCTCCTGTCAGATCAGCAGTGGC
 ATTAATTTCTCATAGCAGCACAAACCCTGTCATGAACTGCACATGCGAGGGAT
 CTAGGTTGTGCGCTCCTTATGAGAATCTAATGCCTAATGACCTGTCACCGTCTC
 CCATCACCCCTAGATGGGAGTGTCTAGTTGCAGGAAACAAGCTCAGGGCTTCC
 ACTGATTCTACATTATGGTGAGTTGTATAATTATTTTATTATATAATACAATGT
 AATAATAATAGAAACACAGTGCACAACAATGTAATGTGCTTGAATCATCCCC
 AAACCATCCCAGTCCACGGTCTTCCACATTTTGTCTTTTTCACAAAATTGTCTTC
 CACAAACTGGTCCCTGGTGCCAAAAAGGCTTGGGACCACTGCTTTAAAGCCT
 TTGCATAGTGCTTAGAATTGAGGGGGAAAAAACAACAATGTAGCT
 AGTTGCTACAATCACTATATTGGTGAGTTTCAAAGGAAAAGAATTCTGTCCC
 ATTTATGCTTGAGCCTTGAGTTGCTAACCAAGCCTGACACAAAATTACTGTTG
 AAGGGATGTGTGAGTCCTAATTGAAATGAGGCCTCTTAAGGGAATTGTGGACC
 AAACCCCAAGCAGGCAGAAAGCCGTATCTTAATTATTGCAAGTATTTTCAAGGCA
 AGGTGTGGATGGCCATTTGAATTCAAGCAGACTAGGACCTGGGATGAGAAAG
 AAGGTGTGTACGTGACTTGATCTTTGAACTTTAGCTCACCATCTGGAAGAAGG
 CTGAGTATTCTCTGCACTCACATAGTAGCTAATGCCTACTCCCCAGCCACCCAC
 AATTCTTTCTGTAGGAAGGCTCGCTAGAATACTTTGTGATATTGGATATTAGTT
 CCATATTCTACTGTGTATCTTAGTTCAACCAAATTGTAATCATCTGATATTTAT
 TTCTTTTAAATATAAATATAAGTATATTAAGTCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA

10

20

30

40

【 0 1 2 0 】

リアルタイム RT - PCR

全 RNA 1 μg を 10 μg 反応で逆転写に用いて、その 2 μL を PCR に用いた。全ての実験を 2 回または 3 回繰り返した。PCR を 45 サイクル (熱変性 : 95 °C、15 秒 ; アニール / 伸長 : 60 °C、1 分) を、以下のプライマー : フォワードプライマー : 5'-TCACTGACAACATCGACTTTGAAG (SEQ ID NO : 2) ; リバースプライマー : 5'-GGAGAAAACGCTTAGCCATACAG (SEQ ID NO : 3) ; プロブ (SEQ ID NO : 4) : 6Fam-CTGGCCAGCCCTGCCACTTACCA-Tamra で実行した。絶対的な定量を、製造業者説明書 (PE Biosystems , User Manual 2) に従

50

って行った。GAPDH遺伝子を参照遺伝子として用いた。したがって、それぞれのサンプルを、そのGAPDH含有量（発現のレベル）に従って、また標準物質（SK-CO-10）に対して標準化した。相対量を次式によって確定した： $2^{-C_T \text{CCAT-1} - C_T \text{SK-CO-10}}$ 。プラスミドDNAを含有するCCAT-1 cDNAの希釈に対応する基準曲線を描き、そしてSK-CO-10の中でCCAT-1 mRNAの量を定めるのに使用した。この因子を、それぞれのサンプルの相対量と乗算して、CCAT-1の量を100 ng cDNA毎のfgとして得た。すべての実験はABI Prism 7000系（Applied Biosystems, Foster City, CA）を用いて実施した。

【0121】

実施例2：結腸および直腸の正常組織および腺癌におけるCCAT-1発現

CCAT-1発現を、18の正常組織で定量リアルタイムPCRにて試験した（図1）。CCAT-1発現は、腎臓における0.008 fg（骨格筋肉）から402 fgの範囲である。SK-CO-10と比較して、正常組織におけるCCAT-1レベルは、20倍（腎臓）で、350倍を超える（結腸）低さであった。対照的に、腫瘍組織における平均CCAT-1 mRNAレベルは2090 fg（通常の結腸と比較して、 $p < 0.0001$ ）で、そして280 fg（27）から8000 fg（11）以上で変動する（図2）。腫瘍に隣接した正常組織において、平均CCAT-1 mRNAレベルは587 fg（通常の結腸と比較して、 $p = 0.04$ ）で、そして0.1 fg（N29）から6631 fg（N14）まで変動する（図2）。図2で、腫瘍サンプルと正常組織に隣接した組織の対

10

20

【0122】

実施例3：末梢血液の単核細胞（PBMCs）におけるCCAT-1の校正曲線

研究のこの部分における全ての実験を、ABI Prism 7500装置（Applied Biosystems, Foster City, CA）を用いて実施した。所定のサンプルにおけるCCAT-1含有量の定量的測定値を有するために、校正曲線を作成した。結腸癌細胞株HT-29およびCOLO-205をATCC（Manassas, VA）から得た。末梢血単核細胞（PBMC）を、10人の健康な志願者の末梢血液から得た。PBMCsをフィコールの勾配方法で分離し、そして-70で保存した。PBMCsと結腸癌細胞を、濃度結腸癌細胞を増加（1:1×10⁶, 1:5×10⁵, 1:1×10⁵, 1:5×10⁴, 1:1×10⁴, 1:5×10³, 1:1×10³, 1:500, 1:100, 1:50, 1:10, 1:1, および純粋な結腸癌細胞）して混合した。

30

【0123】

RNAを抽出して、CCAT-1に関してリアルタイムPCRを実施した。癌細胞の小集団の検出で、CCAT-1に対するRT-PCRの感度を研究するために、校正曲線を作成した（図3～5）。増加した濃度で結腸癌細胞株（HT29）の細胞を10⁶個PBMCsと混合した。癌細胞の検出に関する最も低い閾値は、10⁶個PBMCsに対して5癌細胞濃度であった（図3）。

【0124】

実施例4：正常の結腸粘膜、前癌状態の粘膜、腺腫ポリープ、一次性結腸腺癌、および遠隔転移におけるCCAT-1発現

良好状態、結腸腺癌部と隣接した正常粘膜、線種ポリープ、一次性結腸腺または直腸の癌、および肝臓または腹膜転移からのサンプルの結腸切除を受ける患者から得た正常の結腸粘膜サンプルを、液体窒素の中で凍結状態にする。RNAを、前述したように、全ての組織サンプルから抽出して、CCAT-1に関するリアルタイム定量PCRを実施した（図6）。

40

【0125】

実施例5：血液の潜在性転移性疾患および大腸癌患者のリンパ節の検出患者

50

組織学的に慢性一次性結腸腺癌を有する18歳以上の患者を、研究の参加に申し出た。遠隔転移を伴う患者、または前に放射線もしくは化学療法を受けた患者を、研究から除外した。研究のプロトコールは、Institutional Review Board (IRB, Helsinki Committee) Hadassah-Hebrew University Medical Centerに承認された。書面での告知に基づく同意を、全ての研究参加者から得た。

【0126】

標識リンパ節のマッピングおよび採取

患者は、流入領域リンパ管を含有する腸間膜の通常の楔状切除 (wedge) を含む結腸腺癌の標準外科的切除を受けた。外科的試験片 (結腸および腸間膜) 切除後すぐに、イソスルファンブルー染料2~5mL (特許Blue V, France) をツベルクリンの注射器および針を使用して、腫瘍の周りを4つの四半部で副漿膜 (subserosally) に注入した。それから腫瘍およびリンパ管の一括切除は、後ろの表で評価し、腸間膜から全ての青い結節を切開した。

10

【0127】

結節の縦軸に沿って門で分けた (複数の) SLNの半分を、(複数の) SLNの生体外での識別後、液体窒素で凍結状態にした。一次腫瘍の小さな部分 (全体の腫瘍の体積の~25%) と正常粘膜の小さなサンプル (0.5gr) を同様に凍結状態にした。別々の器材を (複数の) SLNと一次腫瘍の切除に用いて、生体外で結節の腫瘍細胞の汚染を最小にする。

20

【0128】

病理学的処理およびサイトケラチン免疫組織化学

付着される腸間膜および残り半分の (複数の) SLNと共に一次腫瘍試料片を、別々にラベルした試料としてDepartment of Pathology, Hadassah-Hebrew University Medical Centerに提出した。結腸腺癌の診断が確認されると、ホルマリン固定、パラフィン包埋ブルー節を、4段階で約40µmの厚さに切断した連続的な方法を受け、H&E染色した。さらに2つの染色されていないスライドを、免疫組織化学的染色で第2および第4レベルのブロックに調製し、1つはサイトケラチン抗体染色で、他はネガティブコントロールとしてもたらずのものである。免疫組織化学的染色を、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体方法を使用して、SLNのホルマリン固定およびパラフィン包埋切片に行った。商業的に得られるサイトケラチン抗体複合物を本研究で使用した (Pan-keratin AE1/AE3, CAM 5.2, 35bH11, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)。内在性ペルオキシダーゼは、1%の過酸化水素と培養して抑制された。ジアミノベンジジンテトラヒドロ塩化物 (DAB, Biogenex, San Ramon, CA) をクロモゲンとして使用した。扁桃腺のホルマリン固定パラフィン包埋切片をポジティブコントロールとして、そしてSLNブロックからの切片をネガティブコントロールバッファーと培養した。合計で4個のH&Eと2個のサイトケラチン免疫染色切片を、SLNからの組織のそれぞれのブロックで検査した。陽性が強い個体の細胞または細胞集団を、結腸癌細胞の解剖学的および細胞学的な特徴を示したものと確認した場合には、サイトケラチン免疫染色を陽性とみなした。

30

40

【0129】

実施例6: サイトケラチン-20に関するRT-PCR、標識リンパ節のCCAT-1 RNA抽出

全RNA抽出をTriReagent方法により、全てのサンプル (腫瘍、リンパ節、血液、および正常組織) で行った。産物を、cDNA合成の前にRNA品質評価のためゲルに流した。

【0130】

凍結したサンプルをドライアイスの中で粉末にして、tri-reagent (molecular research center, inc., Cincinnati,

50

oh, usa)の中でポリトロンホモジナイザーを用いて均質にして、そして製造業者の説明書に従って処理した。

【0131】

リアルタイムRT-PCR

全RNA 1 µgを20 µL反応でランダムプライマーと逆転写するために用い、その2 µLをPCRに用いた。全ての実験を2回行った。PCRを40サイクル(変性:95、15秒;アニーリング/伸長:60、1分)で、CK20に対して特異的なプライマーおよびTaqman(登録商標)プローブ(Applied Biosystems, Assays-on-Demand)で行った。CCAT-1発現分析のために、使用したプライマーは上記の通りであった。それぞれのサンプルを、そのGAPDH量に従って標準化した。相対量をCK20発現で標準物質に対して算出した。

10

【0132】

CCAT-1陰性サンプルを、リンパ節と末梢血白血球でリアルタイムPCRでさえも、完全に検出できず、相対量の判定は無関係であり、分析したサンプルをこの転写産物の発現に関して陽性または陰性かで単純に評価した。この部分の研究の全ての実験を、ABI Prism 7500装置(Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて実施した。

【0133】

RNAを抽出し、そしてCCAT-1に対してリアルタイムPCRを行った。

【0134】

大腸癌患者の標識リンパ節におけるCCAT-1発現

リアルタイムPCRを、全ての腫瘍およびSLN組織、並びに悪性のない患者から得た2つの正常リンパ節および健康な個人から得た3つのPBMCSAMPLEで行った。5つのネガティブコントロール全てで、CCAT-1の発現が全くなく、ほんの微量のCK20があった。したがって「陽性」PCRを、CK-20値に対するネガティブコントロール値と比較して50倍高いRNA量で設定して、ネガティブコントロールではCCAT-1増幅が全くないため、我々は陽性としてCCAT-1量を有する全てのSLNを使用した。CRC転移を含む標識リンパ節を、7/44患者でH&E、14/44患者でCKに対するIHC(カイ二乗検定でH&Eと比較して $p < 0.0001$)、そしてPCRで23/44(カイ二乗検定でH&Eと比較して $p = 0.006$ 、図6、表1)と識別した。全てのH&E陽性SLNsはまた、CKに対するIHCおよびPCRでも陽性であった。しかし、7つのSLNsはCKのみに対するIHCで陽性だったが、4つはまたPCRで陽性であった。H&EおよびIHCで12個のSLNs陰性に加えて、PCRで陽性であった(図7)。

20

30

【0135】

CK-20およびCCAT-1に関するqPCRの増幅グラフを示す(図8~9)。cDNAの比較的高い量をCCAT-1と比較してCK-20で増幅する。

【0136】

【表 1】

表1:検出方法で、SLSsにおけるCRC転移の存在

サンプル	H&E	IHC	CK tumor	CK SLN	CCAT-1 腫瘍	CCAT-1 SLN
332	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陰性
456	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
193	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
195	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
479	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
480	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
485	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
400	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
400	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
491	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
491	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
491	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
375	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陰性
360	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陰性
353	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陰性
307	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性
434	陽性	陽性	陽性	陰性	陽性	陽性
434	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
435	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性
435	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性
441	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陰性
447	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性
354	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陰性
381	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陰性
391	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
361	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
374	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性
395	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
395	陰性	陽性	陽性	陰性	陽性	陰性
358	陰性	陽性	陽性	陰性	陽性	陰性
340	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
340	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陰性
392	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
404	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
410	陰性	陽性	陽性	陰性	陽性	陰性
313	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陰性
318	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陰性
373	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
429	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
397	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
498	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
498	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
498	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
501	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
LN		陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
LN		陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
Blood		陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
Blood		陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
Blood		陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

10

20

30

40

【0137】

実施例7:CCAT-1を使用したCRCの早期発見に関する糞便分析法に基づくRNA
 CCAT-1陰性サンプルを、リンパ節および末梢血白血球において、リアルタイムPCR
 でさえも、完全に検知できないため、相対的な量の測定は不適切であり、分析したサ

50

ンプルを、この転写因子の発現に関して、陽性または陰性として単純に評価した。研究のこの部分における全ての実験をABI Prism 7500装置 (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて実施した。

【0138】

RNAを抽出して、CCAT-1に対してリアルタイムPCRを実施した。

【0139】

糞便サンプル

診断された胃腸病学の介護で、完全な結腸内視術を受ける予定に入れた一次性で、非転移性 (臨床ステージI-II) 結腸腺癌の18歳以上の男性もしくは女性または患者を、この研究に登録した。

【0140】

群1 - (N = 15) 組織学的に証明した大腸癌の切除のため手術を受ける患者；

群2 - (N = 15) 結腸内視術で発見した腫瘍またはポリープが全くなく完全な結腸内視術を受ける患者。

【0141】

研究設計

糞便サンプルを収集して、液体窒素内ですぐに凍結状態にした。

【0142】

組織学的に実証された結腸腺癌からの全RNAを、PCRに関するポジティブコントロールとして使用した。ネガティブPCRコントロールは健康な志願者のPBMCsと鋳型 (内部制御) なしの反応混合物からなる。

【0143】

CRC患者の糞便におけるCCAT-1発現

糞便サンプルを、腺癌の15名の患者、および腺癌でない15名の患者から収集した。

【0144】

RNA抽出

糞便サンプルを全ての研究参加者から得た (n = 30)。

【0145】

RNAを新鮮なサンプルから抽出したが、このようなサンプルは分析で十分な量のRNA量を有することができない。結腸内視術、または結腸手術のための腸管前処置の前に、患者からの結腸洗浄物を、十分な量および質で、RNA抽出に使用することができる。しかしながら、この方法は遠心による複数の濃縮工程を必要とする。RNA抽出の好ましい方法を、液体窒素の中で凍結状態の検便であることが分かった。この方法は分析で十分な量のRNAを得た。様々な量の糞便を、150mgの新鮮な凍結糞便から最も高い量および質で達成した。3種類の異なったRNA抽出キットを、Ambion (登録商標) KITによって達成した最も最適な結果と比較した。RNA抽出プロトコルを終了後、RNAを、研究群のサンプル12/15 (80.0%) とコントロール群のサンプル9/15 (60.0%) から効率よく抽出した。

【0146】

PCRの結果

全ての3つのマーカー (A33、Co58、およびCCAT-1) を、まず最初に通常の結腸サンプルにおいて研究した。A-33およびCO-58の両方を正常組織で発現して、したがって我々はCCAT-1を我々の分析の単一のマーカーとして決めた。

【0147】

リアルタイム (定量的) PCRを、十分なRNAを有する全てのサンプルで行った (n = 21)。健康な個人 (n = 9) の糞便で、CCAT-1の所見はなかった。CRC患者からの4/12 (33.3%) の糞便サンプルで、CCAT-1の有意な発現があった (p = 0.001, 表2および図10)。

【0148】

10

20

30

40

【表 2】

表2: CRC患者の臨床的および分子的な特徴

研究	年齢	性別	解剖の位置	段階	悪性度	CCAT-1 発現
P1	77	M	Lt+Rt	3	2	+
P2	70	F	Lt	2	2-3	-
P10	52	M	Lt	1	1	-
P11	65	F	直腸	3	1-2	-
P13	81	F	Lt	3	1-2	-
P14	61	F	Lt	3	2	-
P15	77	M	Lt	3	1-2	-
P16	85	F	直腸	3	2	+
P20	79	M	直腸	3	2-3	-
P22	57	F	Lt	2	1	-
P24	74	M	直腸	2	2	+
P25	66	M	Lt	3	2	+

10

20

【0149】

実施例 8：大腸癌患者の末梢血における CCAT-1 の存在
血液サンプル

15 mL の血液を研究に参加している患者から得た (n = 20)。血液サンプルをフィコール勾配方法で分離し、そして -70 で保存した。RNA を抽出し、そして CCAT-1 に対してリアルタイム PCR を行った。結果を校正曲線と比較した。

【0150】

大腸癌患者の末梢血における CCAT-1 の発現

少数の癌細胞の検出に関して、CCAT-1 に対する RT-PCR の感度を研究するために、我々は校正曲線を作成した。

30

【0151】

増加した濃度における結腸癌細胞株 (HT29) の細胞を、 10^6 個の PBMCs と混合した。癌細胞検出で最も低い閾値は、 10^6 個の PBMCs に対して 50 個の癌細胞濃度の濃度であった (図 3 ~ 5)。

【0152】

図 11 で見られるように、CCAT-1 発現を健康な個人の末梢血サンプルで検出できなかった。対照的に、様々な程度の CCAT-1 の発現を、結腸癌患者の末梢血サンプルで容易に検出することができる。

【0153】

実施例 9：付加的な結腸直腸癌細胞株の中での CCAT-1 発現

CCAT-1 の発現は、広範囲の結腸直腸癌 (CRC) 細胞株で検討した。18 種の CRC 細胞株を実験のために選択した。この状況において、HT-29 を CCAT-1 発現の参照として設定した。RNA を全ての細胞株から抽出して、cDNA を確立された方法を用いて作製した。リアルタイム定量 PCR、すなわち qPCR を用いて、CRC 細胞株のこの群で、相対的な CCAT-1 発現を測定した。

40

【0154】

【表 3】

表3:HT-29と比較したときの18種のCRC細胞株における
CCAT-1発現のリアルタイム(定量)PCRの結果

CRC細胞株	平均のCt
HT 29	25.2
CaCO2	20.49
HCT15	21.102
LS 174T	20.974
SK-CO-1	19.739
SW 403	19.725
SW 1222	19.584
SW 620	21.282
SW 802	19.901
SW 837	18.677
CO 61	19.613
SK-CO-11	18.461
SK CO 10	20.025
SW1083	21.026
HT29	26.229
LOVO	21.04
WS1116	21.366
SW48	20.244
SK-CO-17	20.34

10

20

【 0 1 5 5 】

平均 Ct = 増幅の PCR サイクル (サイクルが低いほど、サンプルにおける特異的な c DNA 容量が高く、CCAT - 1 発現が高い) 。

30

【 0 1 5 6 】

図 1 3 は HT - 2 9 と比較して 1 8 種の結腸直腸癌細胞株の相対的な CCAT - 1 の発現を示す。いずれかの所定のサンプルにおける相対的 CCAT - 1 発現を、HT - 2 9 (= 1) の CCAT - 1 発現と比較した。相対的発現値を、所定のサンプル、サンプルでのハウスキーピング遺伝子 (GPADH)、および HT - 2 9 サンプルの間の平均 Ct の差から算出した。

【 0 1 5 7 】

実施例 1 0 : 結腸直腸癌以外の癌に相当する細胞株における CCAT - 1 発現

他の種のヒトの癌における CCAT - 1 発現を例証するために、いくつかの普通のヒトの癌に相当する多数の細胞株を、CCAT - 1 発現のために qPCR を検査した。

40

【 0 1 5 8 】

非小細胞肺癌

非小細胞肺癌 (NSCLC) は最も一般的なヒトの肺癌である。それは、いまだ世界的に癌関連の死の主な原因である。

【 0 1 5 9 】

CCAT - 1 の発現を、NSCLC 患者対正常の肺組織に相当するものから、ヒトの腫瘍組織で研究した。NSCLC に相当する 1 6 種の細胞株を同様に研究した。CCAT - 1 発現を定量 PCR 分析によって決定した。

【 0 1 6 0 】

50

【表 4】

表4:16種の肺癌細胞株におけるCCAT-1発現のリアルタイム(定量)PCRの結果

サンプル	平均のCt	2-ddCt	
HT 29	25.5	1	結腸基準
612T	25.356	0.3175	NSCLC腫瘍組織
612N	0		対応する肺組織
615T	30.377	0.0117	NSCLC腫瘍組織
615N	36.17	8E-05	対応する肺組織
618T	37.549	6E-05	NSCLC腫瘍組織
618N	37.407	0.0001	対応する肺組織
629T	29.953	0.0081	NSCLC腫瘍組織
629N	32.276	0.003	対応する肺組織
sk-lc-7	25.769	0.0485	NSCLC
sk-lc-29	0		NSCLC
KNS-6	25.355	0.0177	NSCLC
A549	25.477	0.308	NSCLC
sk-lc-1	26.867	4.5159	NSCLC
sk-lc-12	25.091	0.2512	NSCLC
SW1271	0		NSCLC
Luci4	31.842	0.003	NSCLC
calu1	0		NSCLC
sk-luci-8	27.729	0.0273	NSCLC
sk-lc-13	0		NSCLC
sk-lc-5	28.378	0.0485	NSCLC
sk-lc-19	0		NSCLC
Luci-13	20.259	2.9302	NSCLC
SHP-77	31.673	0.0003	NSCLC
sk-lc-2	36.392	0.0002	NSCLC

【0161】

平均Ct = 増幅のPCRサイクル(サイクルが低いほど、サンプルにおける特異的なcDNA容量が高く、CCAT-1発現が高い)。2-ddCt = ハウスキーピング遺伝子(GPADH)Ct、HT-29 Ctおよび関連Ctのサンプルの間で算出したLogの差。CCAT-1の過剰発現を2/16細胞株(12.5%)で測定して、2種の細胞株はsk-lc-1およびLuci-13であった(表4参照)。

【0162】

NSCLC細胞株におけるCCAT-1発現: 相対的な発現を、ハウスキーピング遺伝子、HT-29 (=1)および関連のサンプルの間のCtにおける差から算出した。

【0163】

図14は、HT-29と比較した16種のNSCLC癌細胞株の相対的CCAT-1発現を示す。いかなる所定のサンプルで相対的CCAT-1発現を、HT-29 (=1)のCCAT-1発現と比較した。相対的発現値を、所定のサンプル、ハウスキーピング遺伝子(GPADH)、およびHT-29サンプルの間の平均Ctの差から算出した。

【 0 1 6 4 】

実施例 1 1 : 乳癌細胞株における C C A T - 1 発現

乳癌は、女性における癌に関連した死亡率の主要な原因である。診断および治療の大きな進歩にもかかわらず、進行期で患者の全体的結果は劣っている。診断、病期診断および治療に関する新規標的は両方の疾患で結果を改善することが重要である。したがって、乳癌を示す 1 3 種の細胞株を、q P C R を使用して C C A T - 1 の発現でスクリーニングした。

【 0 1 6 5 】

【表 5】

10

表5: 乳癌細胞株におけるCCAT-1の発現のリアルタイム(定量)PCRの結果

細胞株	平均のCt	2-ddCt	
HT 29 1-3-08	25.5	1	結腸基準
MDA MB 468	35.2075	7E-05	乳
sk-br-5	0	0	乳
HTB	0	0	乳
BTOO	0	0	乳
CAMA	33.871	9E-05	乳
MCF7	37.573	1E-05	乳
SK-BR-3	35.426	2E-04	乳
HCC1954	23.373	0.054	乳
MDA MB 231	31.316	0.002	乳
MDA MB 175	0	0	乳
BT20	35.033	3E-05	乳
BT474	36.782	9E-06	乳
MDA MB 453	0	0	乳

20

30

【 0 1 6 6 】

平均 C t = 増幅の P C R サイクル (サイクルが低いほど、サンプルにおける特異的な c D N A 量が高く、C C A T - 1 発現が高い) 。

【 0 1 6 7 】

2 - d d C t . = ハウスキーピング遺伝子 (G P A D H) C t 、 H T - 2 9 C t および関連 C t のサンプルの間で算出した L o g の差。

【 0 1 6 8 】

研究した 1 3 種の乳癌細胞株で有意な C C A T - 1 発現は全くなかった。さらに、C C A T - 1 発現を 6 種の黒色腫細胞株において調査した。黒色腫細胞株のいずれも、有意な C C A T - 1 発現を示さなかった。

40

【 0 1 6 9 】

実施例 1 2 : I n S i t u ハイブリダイゼーション分析

結腸癌組織で C C A T - 1 の発現を検証して、発現の形態的なパターンを研究するために、i n - s i t u ハイブリダイゼーションを行った。

【 0 1 7 0 】

腫瘍組織 (n = 2) および隣接した正常の粘膜 (n = 2) を含むパラフィンの固まりからのスライドを染色に使用した。

50

【0171】

CCAT - 1に関するプローブ(図16Aに示す; SEQ ID NO. 5)を、以下の配列を有するCCAT - 1発現の形態的なパターンの分析で使用するために調整した:

```

CCCGGATCCGGCGTTAATAGCTAGCTGGATGAAATGTTTAACTTCTAGGCCAGGC
ACTACTCTGTCCCAACAATAAGCCCTGTACATTGGGAAAGGTGCCGAGACATG
AACTTTGGTCTTCTCTGCAATCCATCTGGAGCACTCACTGACAACATCGACTTT
GAAGTGCACCTGACGGGIGT

```

10

【0172】

遺伝子が翻訳されないので、プローブをセンスプローブとアンチセンスプローブを作成するために、2つの異なるプラスミドで複製した。アンチセンスRNAプローブを、pBluescript - KS (pBSSKs、3Kbpの長さのバクテリアベクター)の中への挿入でT7 RNAポリメラーゼによって合成して、センスRNAプローブをpBluescript - SK (pBSSKs、3Kbpの長さのバクテリアベクター)の中への挿入でT7 RNAポリメラーゼによって合成した。挿入の大きさは165bpであった(図15)。2つのプラスミドは:

1. pBluescript - SK (+) [pBSSK+], バクテリアベクター3Kbpの長さ
2. pBluescript - SK (-) [pBSSK-], バクテリアベクター3Kbpの長さ

20

【0173】

これらのベクターは、市販で例えばStratagene, CAからのものである。他のベクターおよび同様のものはこの点において利用できることを理解すべきである。

【0174】

図16Bは、結腸腺癌(a)および隣接した通常組織(b)におけるCCAT - 1染色を示すスクリーニングに基づくIn situハイブリダイゼーションを例証する。CCAT - 1が隣接した正常の粘膜で染色した場合の比較的低い強度に比べて、比較的強いCCAT - 1染色を腫瘍組織(a)に見た。これは、腫瘍に隣接する正常粘膜における低いCCAT - 1発現を示すリアルタイムPCRの結果と相関する。

30

【0175】

実施例13: 健康な志願者の末梢血におけるCCAT - 1発現

健康な志願者(n = 10)の血液サンプルにおけるCCAT - 1発現をさらに研究した。

【0176】

図17は健康な志願者の末梢血サンプルにおけるCCAT - 1の発現を示すグラフである。CCAT - 1 cDNA(発現)の相対量を、全ての血液サンプルにおいて検出しなかった。予想通り、ポジティブコントロールとして腫瘍組織を含むT - 400サンプルで強いCCAT - 1増幅があった。

40

【0177】

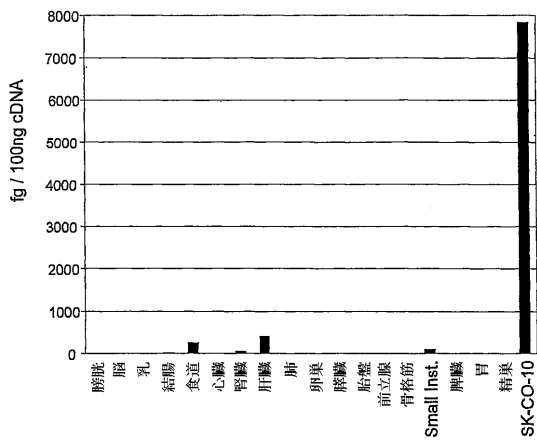
[参照]

1. Cancer statistics, 2000. Greenlee RT - CA Cancer J Clin - 2000 Jan - Feb; 50(1): 7 - 33.
2. Midgley R, Kerr D. Colorectal cancer. Lancet 1999; 353: 391 - 399.
3. Cohen Am, Kelsen D, Slatz L, et al. Adjuvant therapy for colorectal cancer.

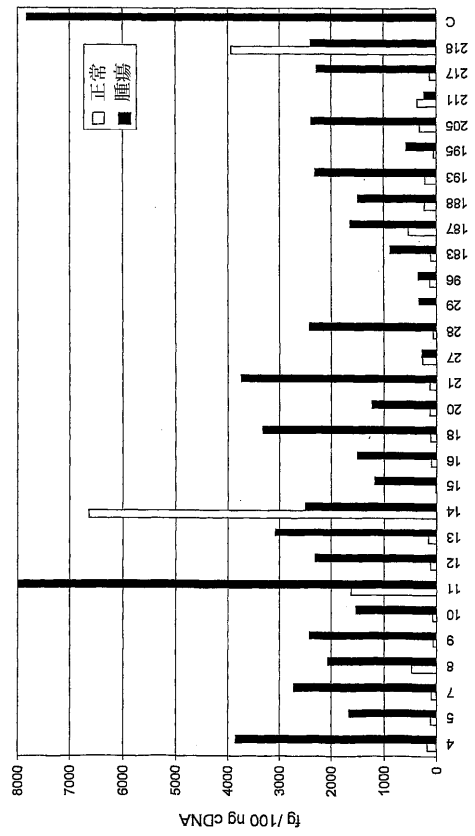
50

Curr Prob Cancer 1998 ; 22 : 5 - 65 .

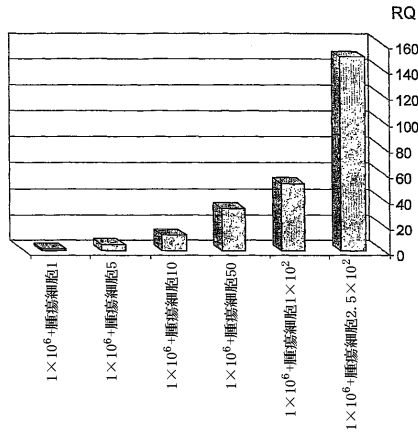
【 図 1 】



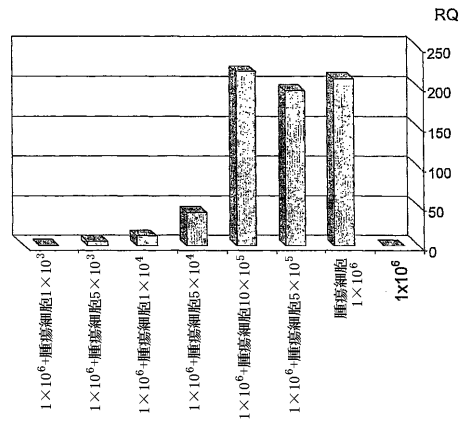
【 図 2 】



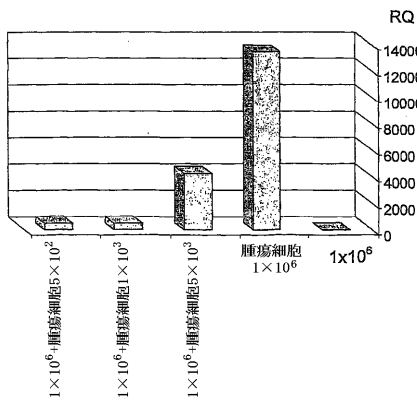
【 図 3 】



【 図 5 】



【 図 4 】



【 図 6 】

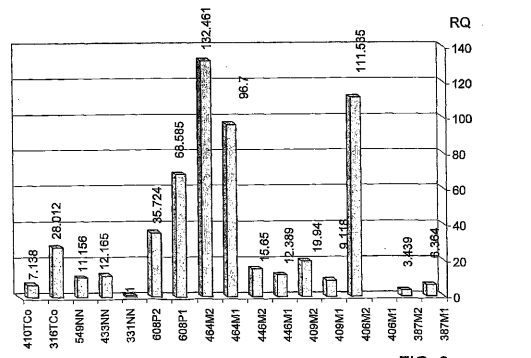
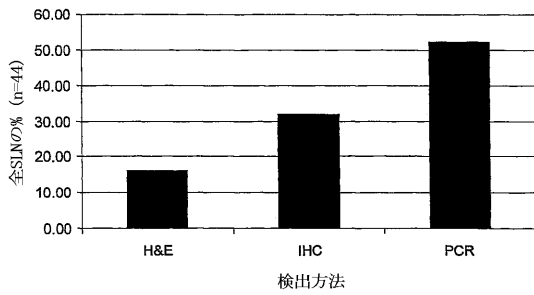
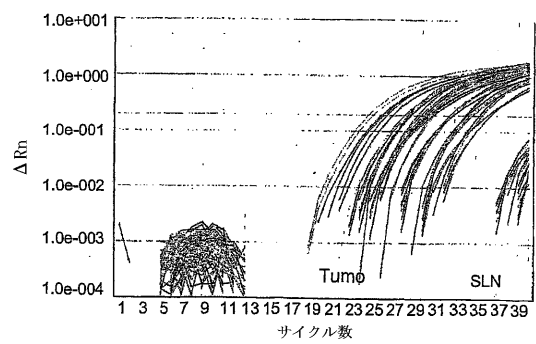


FIG. 6

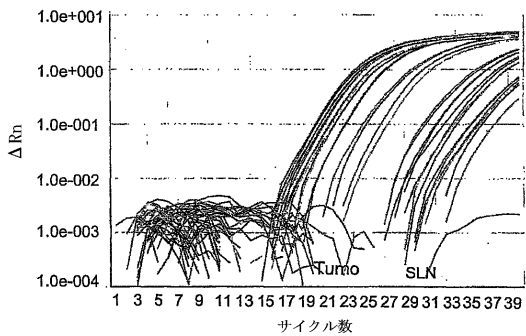
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 8 】



【 図 10 】

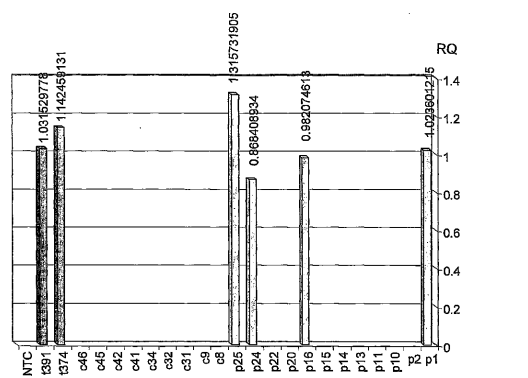


FIG. 10

【 図 1 1 】

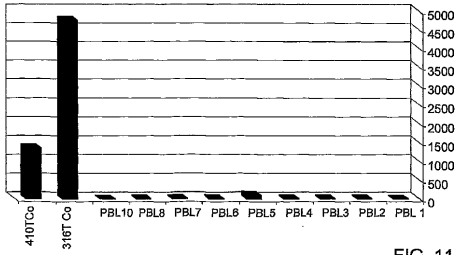


FIG. 11

【 図 1 2 】

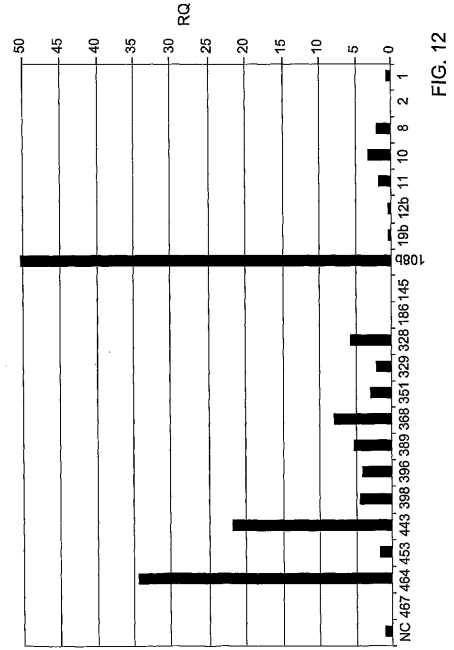
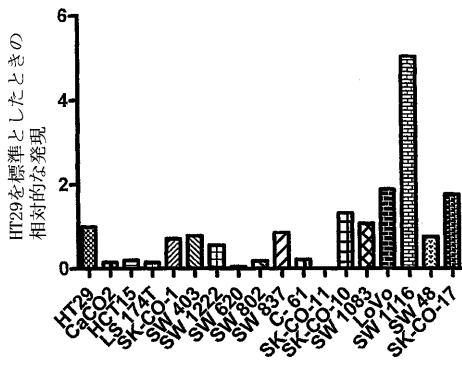
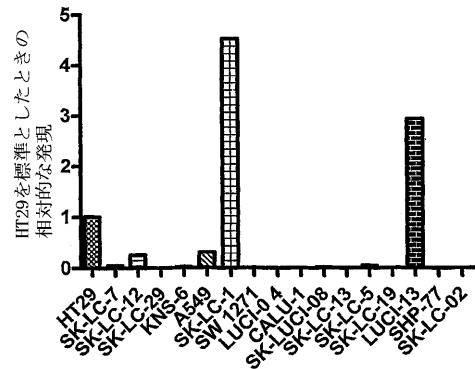


FIG. 12

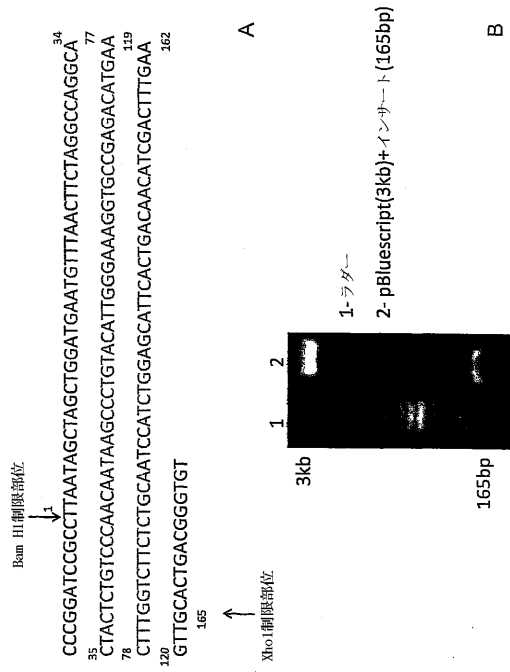
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 A 】



FIG. 16A

【 図 1 6 B 】

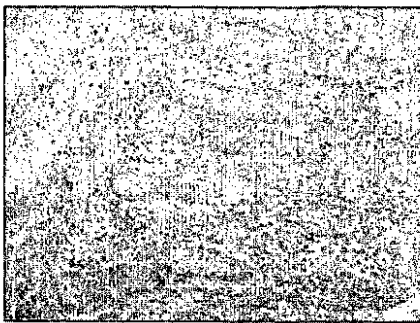


FIG. 16B

【 図 1 7 】

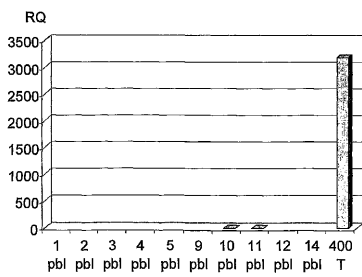


FIG. 17

【配列表】

2011511635000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2009/000163

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OTA T ET AL: "COMPLETE SEQUENCING AND CHARACTERIZATION OF 21,243 FULL-LENGTH HUMAN CDNAS" NATURE GENETICS, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, US, vol. 36, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 40-45, XPO01191004 ISSN: 1061-4036 page 44, column 2, paragraph 4 - page 45, column 1, paragraph 2 -/--	14-17, 21-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 25 June 2009		Date of mailing of the international search report 10/07/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tilkorn, A

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2009/000163

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>-& DATABASE EMBL [Online] 9 September 2003 (2003-09-09), "Homo sapiens cDNA FLJ43320 fis, clone NT2RI2024935." XP002534077 retrieved from EBI accession no. EMBL:AK125310 Database accession no. AK125310 cited in the application the whole document</p>	14-17, 21-23
X	<p>WO 01/94629 A (AVALON PHARMACEUTICALS [US]) 13 December 2001 (2001-12-13) abstract SEQ ID NO: 285 page 16, line 22 - page 17, line 19 page 35, line 18 - page 36, line 20 -& DATABASE Geneseq [Online] 15 May 2002 (2002-05-15), "Colon adenocarcinoma related gene sequence SEQ ID NO:285." XP002534078 retrieved from EBI accession no. GSN:ABL61948 Database accession no. ABL61948</p>	14,17-20
X	<p>ZHANG L ET AL: "Gene expression profiles in normal and cancer cells" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, WASHINGTON, DC, vol. 276, 23 May 1997 (1997-05-23), pages 1268-1272, XP002083785 ISSN: 0036-8075 abstract page 1270, column 1, paragraph 1 - page 1271, column 3, paragraph 1; tables 3,4</p>	1-13, 24-30
X	<p>ODEBERG J ET AL: "A cDNA RDA protocol using solid-phase technology suited for analysis in small tissue samples" BIOMOLECULAR ENGINEERING, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 17, no. 1, 1 October 2000 (2000-10-01), pages 1-9, XP004257819 ISSN: 1389-0344 the whole document</p>	1-13, 24-30

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (Apr'12/06)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2009/000163

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HESS J ET AL: "Application of differential cDNA screening techniques to the identification of unique gene expression in tumours and lymphocytes" CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, OXFORD, GB, vol. 10, no. 2, 1 April 1998 (1998-04-01), pages 125-130, XP004327175 ISSN: 0952-7915 the whole document</p>	1-13, 24-30
A	<p>PERRY ET AL: "Expression of the CUB domain containing protein 1 (CDCP1) gene in colorectal tumour cells" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 581, no. 6, 13 March 2007 (2007-03-13), pages 1137-1142, XP005932065 ISSN: 0014-5793 the whole document</p>	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL2009/000163

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
- table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- on paper
- in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the international application as filed
- filed together with the international application in electronic form
- furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IL2009/000163

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0194629	A	13-12-2001	AU 6455901 A	17-12-2001
			CA 2411601 A1	13-12-2001
			EP 1358349 A2	05-11-2003
			JP 2004509612 T	02-04-2004

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1	
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00		A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100135172

弁理士 野田 裕子

(74) 代理人 100144266

弁理士 鈴木 一寿

(72) 発明者 アヴィラム ニッサン

イスラエル国 9 6 3 4 3 エルサレム ベット ハカレム ストリート 1 9

(72) 発明者 ステラ ミトラニ ローゼンバウム

イスラエル国 9 6 1 9 0 エルサレム シュロモ テスマー ストリート 1 - 3

(72) 発明者 ハーバート ラドルフ フレウンド

イスラエル国 9 2 6 2 1 エルサレム カツェネルソン ストリート 7 - 2

(72) 発明者 タマル ペレッツ ヤブロンスキー

イスラエル国 9 6 7 5 7 エルサレム クボヴィ ストリート 4 5

(72) 発明者 マリナ ロイスタチャー

イスラエル国 9 0 9 1 7 ギヴァート ジーヴ ギヴォン ストリート 1 3 0 - 1

(72) 発明者 ルロイド ジェー オールド

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 1 5 8 ニューヨーク サード アヴェニュー 6 0 5

(72) 発明者 ゲルド リッター

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 2 1 - 6 0 0 7 ニューヨーク ボックス 3 2 ヨーク アヴェニュー 1 2 7 5

(72) 発明者 アリ オー ギュレ

トルコ共和国 0 6 8 0 0 アンカラ ビルケント ユニヴァーシティ エスピーー 2 4 8 デパートメント オブ モレキュラー バイオロジー アンド ジェネティクス

F ターム(参考) 4B024 AA12 BA80 CA04 CA12 DA02 EA04 HA14

4B029 AA07 BB11 BB20 CC02 FA12

4B063 QA19 QQ08 QQ43 QQ53 QR32 QR36 QR55 QR77 QS34 QX01

4B065 AA93X AA93Y AC14 CA24 CA46